

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

# **Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit quantitativem und funktionellem Protein C-Mangel**

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Thomas Hofmockel,

geboren am 21.02.1980 in Rudolstadt

aus Dresden

Rostock, 2012

**Dekan der Medizinischen Fakultät:**

Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität

Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Volker Kiefer

Institut für Transfusionsmedizin, Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Gabriele Siegert

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität

Dresden

**Datum der Einreichung: 29.10.2012**

**Datum der Verteidigung: 19.06.2013**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	8
1.1. Vom Autoprothrombin II-a zum aktivierten Protein C	8
1.2. Protein C im Gerinnungssystem	8
1.3. Gen- und Proteinstruktur von Protein C	13
1.4. Der angeborene Protein C-Mangel	15
1.5. Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2. Materialien und Methoden</b>	19
2.1. Patienten	19
2.2. Protein C Aktivitäts- und Antigenbestimmung	19
2.3. DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung	20
2.4. Genotypisierung	21
2.4.1. Doppelstrang-Amplifikation	21
2.4.2. Einzelstrang-Amplifikation	26
2.5. Sequenzierung	27
2.6. Bestätigung der Mutationen	27
<b>3. Ergebnisse</b>	33
3.1. Patient 1 (43 Jahre, männlich)	33
3.2. Patient 2 (48 Jahre, weiblich)	35
3.3. Patient 3 (82 Jahre, männlich)	38
3.4. Patient 4 (34 Jahre, männlich)	40
3.5. Patient 5 (männlich)	42
3.6. Patient 6 (50 Jahre, männlich)	44
3.7. Patient 7	46
3.8. Patient 8 (3 Jahre, weiblich)	48
3.9. Patient 9 (32 Jahre, weiblich)	51
3.10. Patient 10 (44 Jahre, männlich)	53
3.11. Patient 11 (25 Jahre, weiblich)	55
3.12. Patient 12 (15 Jahre, männlich)	55
3.13. Patient 13 (29 Jahre, weiblich)	56
<b>4. Diskussion</b>	58
4.1. Patient 1	59
4.2. Patient 2	62
4.3. Patient 3	63
4.4. Patient 4	64
4.5. Patient 5	65
4.6. Patient 6	66
4.7. Patienten 7 und 8	67
4.8. Patient 9	68
4.9. Patient 10	69
4.10. Patienten 11, 12 und 13	70
<b>5. Zusammenfassung</b>	71
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	72
<b>7. Thesen</b>	80
<b>8. Eidesstattliche Erklärung</b>	82
<b>9. Danksagung</b>	833

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Alanin
Abb	Abbildung
Ala	Alanin
APC	Aktiviertes Protein C
APTT	Activated partial thromboplastin time (aktivierte partielle TPZ)
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AT III	Antithrombin III
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin, Zystein
Cys	Zystein
D	Asparaginsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPCR	Endothelial protein C receptor
F	Phenylalanin
G	Guanin, Glyzin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glyzin
FV-X(a)	Gerinnungsfaktoren V bis X (aktivierte)
H	Histidin
HELLP	Haemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count
HMWK	High molecular weight kininogen
His	Histidin
HNF	Hepatocyte nuclear factor

I	Isoleuzin
Ile	Isoleuzin
INR	Internationale Ratio
K	Lysin
kD	Kilodalton
L	Leuzin
LAE	Lungenarterienembolie
Leu	Leuzin
Lys	Lysin
M	Methionin
Met	Methionin
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
Mut	Mutation
N	Asparagin
P	Prolin
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor-1
PC	Protein C
PCI	Protein C-Inhibitor
PCR	Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PS	Protein S
PT	Prothrombin time (Quick-Test, Thromboplastinzeit)
Q	Glutamin
R	Arginin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
S	Serin
Ser	Serin
T	Thymin, Threonin
Tab	Tabelle
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor

TBE	Tris-Borat-EDTA
TF	Tissue factor (Gewebsthromboplastin)
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
Thr	Threonin
TM	Thrombomodulin
Trp	Tryptophan
TVT	Tiefe Venenthrombose
Tyr	Tyrosin
t-PA	Tissue plasminogen activator
V	Valin
Val	Valin
VWF	von Willebrandfaktor
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

## **1. Einleitung**

### **1.1. Vom Autoprothrombin II-a zum aktivierten Protein C**

Im Jahr 1960 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Mammen und Seegers eine Arbeit über die Entdeckung eines Antikoagulanz, welches bei der Zusammenführung von Thrombin mit dem Prothrombinase-Komplex wirksam wurde. Sie vermuteten, dass es ein Fragment vom Prothrombin sei und gaben diesem Antikoagulanz den Namen Autoprothrombin II-a (Mammen et al., 1960).

Sechzehn Jahre später isolierte Johan Stenflo auf der Suche nach weiteren Vitamin K-abhängigen Proteinen, wie die bereits bekannten Faktoren II, VII, IX und X, aus Rinderplasma ein bis dahin unbekanntes Protein, das ebenfalls  $\gamma$ -Glutaminsäurereste aufwies. Da dieses Protein in der Chromatografie durch einen Peak in Pool C repräsentiert wurde, erhielt es von Stenflo die Bezeichnung „Protein C“ (Stenflo, 1976).

In einem Rückblick auf die Geschehnisse im Jahr 1960 revidierte Seegers die Vermutung von der Abstammung des Autoprothrombin II-a vom Prothrombin und erklärte, dass das „neue“ Protein C die inaktive Vorstufe des „alten“ Autoprothrombin II-a sei (Seegers et al. 1976). Kisiel et al. konnten als Aktivator für das Protein C Thrombin identifizieren (Kisiel et al. 1979). In den folgenden Jahren wurde die wesentliche antikoagulatorische Eigenschaft in der Inaktivierung des aktivierten Faktors V beschrieben (Walker et al. 1979) und es wurden auch weitere Kofaktoren, wie das Thrombomodulin, der Faktor V und das Protein S, des nun als Protein C-pathway beschriebenen antikoagulatorischen Systems, entdeckt.

### **1.2. Protein C im Gerinnungssystem**

Die zentrale Stellung im Gerinnungssystem nimmt das Enzym Thrombin ein. Die Aktivierung der Thrombozyten, die Umwandlung von Fibrinogen zum Fibrin und die positiven und negativen Feedbackmechanismen sind wichtige Funktionen des Thrombins (Mann et al. 2003). Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Exposition von negativ geladenen Phospholipiden, insbesondere der Phosphatidylserinen, an deren Oberfläche. Die negativ geladenen Phospholipide sind essentiell für die Bindung von Gerinnungsfaktoren und für die Zusammensetzung von Enzym-Kofaktorkomplexen. Vor allen die Vitamin K-

## Einleitung

abhängigen Gerinnungsfaktoren (FII, FVII, FIX, FX, PC und PS) gehen diese Bindung über ihre  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäurereste ein (Zwaal et al. 1998).

Für die Bildung von Thrombin und somit die Initiierung der Gerinnung ist der Kontakt von im Plasma zirkulierenden aktivierten Faktor VII an den im extravaskulären Raum vorkommende membrangebundenen Tissue Factor (TF) der entscheidende Auslösefaktor. Der FVIIIa-TF-Komplex überführt die Faktoren IX und X in ihre aktiven Formen. Der aktivierte Faktor X bildet mit dem aktivierten Faktor V und Kalziumionen den membrangebundenen Prothrombinase-Komplex, der Thrombin aus seiner Vorstufe Prothrombin entstehen lässt. Der Faktor V wird hauptsächlich durch Thrombin selbst und den aktivierten Faktor X aktiviert. Der membrangebundene Tenase-Komplex setzt sich aus dem aktivierten Faktor IX, dem aktivierten Faktor VIII und Kalziumionen zusammen und ist ebenfalls für die Aktivierung von Faktor X zuständig. Neben dieser Feedback-Schleife greifen noch verschiedene andere in das Gerinnungssystem ein. So fördert und hemmt zum Beispiel das Thrombin die eigene Generierung über die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und durch den Einfluss auf das Protein C-System im Sinne positiver und negativer Rückkopplung (Esmon 2003, Mann et al. 2003, Dahlbäck 2005).

Das Protein C ist ein Polypeptid, das hauptsächlich in den Leberzellen synthetisiert wird. Kleinere Mengen können auch im Endothelium gebildet werden. Zu 85 bis 90% wird es in einer zweikettigen Form in den Blutkreislauf entlassen, bestehend aus einer schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 41 kD und einer leichten Kette mit einem Molekulargewicht von 21 kD. Die mittlere Konzentration des inaktiven Proteins im Blut beträgt 4-5  $\mu\text{g/ml}$  und die der aktivierten Form 1-3 ng/ml (Yan and Dhainaut 2001).

Um seine biologischen Funktionen erfüllen zu können, muss das Protein C von seiner im Blut zirkulierenden inaktiven Zymogenform in aktiviertes Protein C (APC) überführt werden (Esmon et al. 1976). Dieser Prozess erfolgt durch Proteolyse. Dabei wird ein Dodecapeptid vom aminoterminalen Ende der schweren Kette des Proteins abgespalten (Kisiel 1979) und es entsteht die eigentlich wirksame Serinprotease. Die effektivste physiologische Aktivierung von Protein C erfolgt durch



## Einleitung

einen membrangebundenen Komplex aus Thrombin, Thrombomodulin und EPCR in Anwesenheit von Kalziumionen.

Owen und Esmon beschrieben 1981 die hoch affine Bindung von Thrombin an das transmembrane Glykoprotein Thrombomodulin (Esmon and Owen 1981). Durch diese Bindung wird der Vorgang der Protein C-Aktivierung durch Thrombin, welches allein ein wenig effizienter Protein C-Aktivator ist, um mehr als das 1000fache gesteigert (Esmon 2003; Van de Wouwer et al. 2004). Es existieren verschiedene Theorien über den eigentlichen Vorgang der Aktivierung. Das Modell von Yang, Manithody und Rezaie beschreibt, dass in Abwesenheit von Kalziumionen das aktive Zentrum von Thrombin nicht an das Aktivierungspeptid von Protein C passt. Durch die Bindung von Kalziumionen an die 70-80-Schleife (Nomenklatur entsprechend der Serinprotease) von Protein C wird die Verbindung zwischen den Seitengruppen von Arg-67 und Arg-82 unterbrochen. Dadurch bildet sich eine positiv geladene Oberfläche des Protein C, die in Verbindung mit der EGF-Domäne 4 von Thrombomodulin treten kann. Über weitere Zwischenschritte kommt es nur nach Bindung mit Thrombomodulin zur Konformationsänderung des Aktivierungspeptides von Protein C, das nun komplementär zum aktiven Zentrum von Thrombin ist (Yang et al. 2006).

Besonders hohe Konzentrationen an Thrombomodulin finden sich im Endothel des Kapillarnetzes. Dadurch kommt es besonders im Kapillarnetz zu einer schnellen Bindung des bis dahin prokoagulatorisch wirksamen Thrombins an das Thrombomodulin und zu einer entsprechend schnelleren Aktivierung des antikoagulatorisch wirksamen Protein C (Esmon 2003). Der endotheliale Rezeptor für Protein C (EPCR) befindet sich ebenfalls an der Endothelmembran. Durch dessen Bindung an die Gla-Domäne von Protein C wird die Aktivierung durch das an Thrombomodulin gebundene Thrombin in vivo um das 20fache beschleunigt (Taylor et al. 2001; Esmon 2000). Erst wenn sich APC vom EPCR gelöst hat, wird es antikoagulatorisch aktiv. Die Bindung des Protein C mit dem EPCR ist auch für die zytoprotektiven Wirkungen des Protein C wichtig (Griffin et al. 2007).

Die antikoagulatorische Wirkung von APC besteht im Wesentlichen in einer Behinderung der Generierung von Thrombin. Der für APC hoch sensitive FVa wird

## Einleitung

durch APC an den Positionen R306 und R506 gespalten. Der Spaltung an Position R506 folgt in der Regel die sehr viel langsamere Spaltung an Position R306, die jedoch durch das Vorhandensein des Kofaktors Protein S um das 20fache beschleunigt wird (Rosing et al. 1995). Allein die Spaltung an Position R506 führt zum teilweisen Verlust der Kofaktor-Funktion von Faktor V. Die Inaktivierung des auf APC ebenfalls hoch sensitiven FVIIIa erfolgt durch die Spaltung an den Positionen R336 oder R562 von FVIII (Kalafatis and Mann 2001, Fay 1999). Hier ist die Spaltung einer Position ausreichend, um zum vollständigen Funktionsausfall des FVIII zu führen. Dieser Vorgang wird sowohl durch Protein S wie auch durch Faktor V als Kofaktoren des Protein C beschleunigt.

Die Inaktivierung erfolgt durch Fragmentierung und Desintegration der Faktoren Va und VIIIa und dem damit verbundenen Verlust der Bindungsfähigkeit an die oben genannten Komplexe. Dieser Vorgang findet an negativ geladenen Phospholipidmembranen statt. Die Faktoren werden effektiv nur in ihrer ungebundenen Form durch APC inaktiviert. An den Tenase-Komplex (FVIIIa) oder Prothrombinase-Komplex (FVa) gebunden sind sie zum Teil vor dem Eingriff des APC geschützt. Dies ist auf eine sterische Behinderung der Bindungsstelle für APC an den jeweiligen Faktoren zurückzuführen (Dahlbäck and Villoutreix 2005, Seegers et al. 2007). Der im Blut zirkulierende FVIII ist darüber hinaus an den von-Willebrandfaktor (vWF) gebunden. Diese Bindung stellt einen weiteren Schutz vor dem Zugriff durch APC dar (Koppelman et al. 1996).

Im Gegensatz zum FVIII spaltet APC beim FV neben der aktivierten Form auch die nicht aktivierte Form. Durch die Spaltung der nicht aktivierten Form des FV entsteht ein Zwischenprodukt, das dem APC bei der Degradierung des FVIIIa als Kofaktor dient. Der FV besitzt also ähnlich wie Thrombin, sowohl prokoagulatorische als auch antikoagulatorische Eigenschaften. Die Klinik der FV Leiden-Mutation resultiert im Wesentlichen aus einer mangelnden APC Kofaktor-Fähigkeit des FV im Zusammenhang mit dem Tenase-Komplex (Váradi et al. 1996, Dahlbäck 1999). Bei der FV Leiden-Mutation, die 1994 durch Bettina et al entdeckt wurde, kommt es im Gen von Faktor V zu einer Punktmutation (1691G>A). Diese Mutation führt zur Änderung der Protein C-Spaltstelle 506 von Arginin zu Glutamin. Die Mutation, die zu einer APC-Resistenz führt, ist mit einer Prävalenz von bis zu 10% in der gesunden

## Einleitung

Bevölkerung wesentlich häufiger als Mutationen des Protein C selbst. Sie geht mit einem etwa 5-fach erhöhten Risiko für die Entstehung venöser Thrombosen einher (Emmerich et al. 2001, Segers et al 2007). Die Prävalenz der Faktor V-Leiden Mutation bei Patienten mit angeborener Thrombophilie ist mit ca. 45% sehr hoch (Bertina 1997).

Neben dem FV besitzt APC einen weiteren Kofaktor, das Protein S, welches ebenfalls zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen gehört und die Aktivität von APC am Tenase- und Prothrombinase-Komplex stimuliert. Das Protein S wurde 1977 durch Di Scipio et. al beschrieben, seine Funktionen in Bezug auf Protein C 1980 durch Walker (Di Scipio et al. 1977, Walker 1980). Bei der Inaktivierung von FVIIIa wird die APC-Kofaktor-Fähigkeit von Protein S durch den intakten FV beschleunigt (Shen and Dahlbäck 1994). Das im Blut zirkulierende Protein S ist zu 60 – 70% Teil eines Komplexes mit dem C4b-bindenden Protein. In gebundener Form steht das Protein S dem APC als Kofaktor nicht zur Verfügung, sondern dient in dieser Form der Aktivierung des Komplementsystems (Dahlbäck 2007).

Die Hemmung des APC durch Protein C-Inhibitor, Plasminogenaktivator-Inhibitor 1,  $\alpha$ 1-Proteinase-Inhibitor und  $\alpha$ 2-Makroglobulin erfolgt langsam und hat unter anderem dadurch eine relativ lange Halbwertszeit von ca. 20 Minuten. Die Kofaktoren Heparin und Vitronectin können die Reaktion zwischen APC und PCI bzw. PAI-1 beschleunigen (Suzuki et al. 1989, Heeb and Griffin 1988, Rezaie 2001).

In den letzten Jahren wurden neben der antikoagulatorischen Wirkung von Protein C noch weitere Eigenschaften entdeckt. Demnach besitzt Protein C unter anderem zytoprotektive, antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften. Eine Schlüsselstellung soll dabei die Aktivierung von PAR-1 durch die Interaktion zwischen der Gla-Domäne von Protein C und EPCR sowie die Aktivierung des Sphingosin-Kinase-1-abhängigen Signalweges einnehmen (Rezaie 2010, Lipinski et al. 2011). Insbesondere der Zusammenhang zwischen dem Gerinnungssystem und der Entzündung ist nach der Beobachtung, dass die Gabe von rekombinanten aktivierten Protein C bei Patienten mit schwerer Sepsis das Überleben positiv beeinflusst, aktuelles Thema der Forschung (Semeraro et al. 2010, Levi et al. 2010).

### 1.3. Gen- und Proteinstruktur von Protein C

Mitte der 1980er Jahre gelang es, die Struktur des humanen Protein C Gen zu charakterisieren. Das Gen für Protein C liegt im Chromosom 2 an Position 2q13-14 und umfasst annähernd 11.2 Kilobasen. Es besitzt zu den anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren eine große Homologie. Das Gen besteht aus einer Promotorregion, 9 Exons und 8 Introns. Die korrespondierende mRNA besteht aus 1795 Nukleotiden, die sich aus einem 75 Nukleotide umfassenden nicht kodierenden 5'Segment, einer 1383 Nukleotide (461 Aminosäuren) umfassenden kodierenden Region, dem TAG-Terminationscodon, einem 296 Nukleotide umfassenden nicht kodierenden 3'Segment und einer 38 Nukleotide umfassenden Polyadenylierungssequenz zusammenfasst (Foster et al. 1985, Plutzky et al. 1986, Patracchini et al. 1989).

Im nicht kodierenden 5'Segment befinden sich die Promotorregion, das komplette Exon 1 und die ersten 21 Nukleotide von Exon 2. In diesem Segment wurden verschiedene Regulationselemente beschrieben, z.B. Bindungsstellen für HNF 1 und 3 in der Promotorregion oder für PCE 1 und SP 1 im Exon 1.

Der kodierende Anteil von Exon 2 und die ersten Nukleotide von Exon 3 verschlüsseln das aus 42 Aminosäuren bestehende Leaderpeptid. Das Leaderpeptid setzt sich aus dem hydrophoben Signalpeptid (-42 bis -25) und dem Propeptid (-25 bis -1) zusammen. Das Signalpeptid ist wichtig für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (Nothwehr and Gordon. 1990). Das Propeptid ist wichtig für die Bindung der Vitamin K-abhängigen Carboxylase und leitet somit die posttranslationale Modifikation der  $\gamma$ -Carboxylierung des Precursor-Proteins ein (Suttie et al. 1987). Das Propeptid wird innerhalb des Golgi-Apparates durch eine trypsinartige Protease abgespalten (McClure et al. 1992). Die Propeptidase spaltet ebenso das Lys-Arg Dipeptid und überführt das Protein C in seine zweikettige Form (Foster et al. 1990).

Weiterhin kodiert Exon 3 für die am aminoterminalen Ende des ausgereiften Protein C liegende Gla-Domäne. Die Vitamin K-abhängigen Carboxyglutaminase carboxyliert in den Mikrosomen der Leber die 9 Glutaminsäurereste dieser Region zu  $\gamma$ -

## Einleitung

Carboxyglutaminsäure (Gla)-Reste. Vor der  $\gamma$ -Carboxylierung findet die Glykosylierung von Asparginresten im Endoplasmatischen Retikulum statt, welche für eine effiziente Sekretion wichtig ist (McClure et al. 1992, Suttie et al. 1987). Die Asparaginreste 97, 248, 313 und 329 werden glykosyliert. Asn97 nimmt Einfluss auf die Sekretion von Protein C, während Asn248 Beziehung zur Spaltung des Lys-Arg Dipeptids hat. Eine fehlende Glykosylierung von Asn313 resultiert in einer beschleunigten Aktivierung von Protein C (Grinnell et al. 1991). Das zirkulierende Protein C bildet zu 30% eine  $\beta$ -Form aus. Diese  $\beta$ -Form ist an Position Asn329 nicht glykosyliert, besitzt aber die vollständige biologische Aktivität (Miletich 1990).

Nach einer Reihe von hydrophoben Aminosäuren, die eine amphipathische Helix bilden und in Exon 4 kodiert werden, schließt sich die erste EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne an. Sie wird in Exon 5 kodiert. An der Position 71 befindet sich ein Asparaginsäurerest, der hydroxyliert werden kann. Die  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure ist direkt in die Kalziumbindung des Protein C involviert (Stenfo 1991). Die zweite EGF-ähnliche Domäne wird in Exon 6 verschlüsselt. Diese Domänen sind nach ihrer charakteristischen Anordnung von Disulfidbrücken benannt, die typisch für die Struktur des „epidermal growth factor“ ist.

Das Exon 7 beinhaltet die Informationen für das Verbindungsstück zwischen der leichten und schweren Kette und das Aktivierungspeptid. Das Dipeptid Lys156-Arg157 wird im Golgi-Apparat durch die Endopeptidase Furin in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Reaktion abgespalten (McClure et al. 1992, Drews et al. 1995). Diese Abspaltung ist notwendig, um das Protein C von der einzelsträngigen Form in die doppelsträngige Form zu bringen. In dieser zirkuliert das reife Protein C zu 85-90% im Plasma. An Position Arg169-Leu170 liegt die für die Aktivierung durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex wichtige Spaltstelle. Bei der Aktivierung wird dann das aus zwölf Aminosäuren (158-169) bestehende Aktivierungspeptid abgespalten (Kisiel 1979).

Die Serinproteasedomäne wird von Exon 8 und Exon 9 kodiert und liegt bei dem reifen Protein auf der schweren Kette. In der Serinproteasedomäne liegt die für das aktive Zentrum trypsin-ähnlicher Serinproteasen typische Trias aus den Aminosäuren Histidin (Position 211), Asparaginsäure (Position 257) und Serin (Position 360). Die

schwere Kette ist durch die Disulfidbrücke zwischen Cys141 und Cys277 mit der leichten Kette verbunden. Die Spaltstelle des Protein C-Inhibitors befindet sich in dieser Domäne zwischen den Aminosäuren Arg354 und Ser355.

<b>Exon</b>	<b>Nukleotide nach Foster et al. 1985</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>Verschlüsselte Struktur</b>
<b>2</b>	-21 bis 70	-42 bis -20	Signalpeptid
<b>3</b>	1334 bis 1500	-19 bis 37	Propeptidregion, Gla-Domäne
<b>4</b>	2963	38 bis 45	hydrophobe Aminosäuren
<b>5</b>		46 bis 91	erste EGF-ähnliche Domäne
<b>6</b>	bis 3453	92 bis 136	zweite EGF-ähnliche Domäne
<b>7</b>	6123 bis 6265	137 bis 184	Verbindungsstück, Aktivierungspeptid
<b>8</b>	7139 bis 7256	185 bis 223	Serinprotease-Domäne
<b>9</b>	8386	224 bis 419	Serinprotease-Domäne

**Tab 1:** Genstruktur des Protein C

#### 1.4. Der angeborene Protein C-Mangel

Der Protein C-Mangel wird in erster Linie durch eine Einschränkung der Aktivität des Proteins definiert. Zur Aktivitätsbestimmung des Protein C werden zwei Methoden angewendet. Die eine Methode ist die Messung der Aktivität im APTT-System (koagulometrische Methode), die andere die Messung mittels eines chromogenen Substrates (chromogene Messung). Zur Routinebestimmung wird in der Regel die koagulometrische Methode angewendet. Die Referenzwerte für die Bestimmung der Protein C-Aktivitäten sind laborabhängig. Die Aktivität wird u.a. von Alter und Geschlecht beeinflusst, wie auch von biologischen Varianzen und Gen-Umwelt-Interaktionen (Tait et al. 1993). So ist die Protein C-Aktivität bei Neugeborenen z.B. sehr niedrig, in der Schwangerschaft hoch und steigt während des Alters immer weiter leicht an (Andrew et al. 2001, Miletich 1990). Nach dem Referenzbereich der koagulometrischen Methode im Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Rostock wird von einem Mangel ausgegangen, wenn die Aktivität unter 70% fällt. Sollte unter Ausschluss erworbener

## Einleitung

Mangelzustände der Verdacht auf einen angeborenen Mangel bestehen muss die Aktivitätsbestimmung zur Bestätigung wiederholt werden (<http://www.ilab.med.uni-rostock.de/>). Zur genauen Bestimmung des Protein C Mangeltyps wird neben der Aktivität mit Hilfe des ELISA-Testverfahrens eine Antigenbestimmung durchgeführt.

Der angeborene Protein C-Mangel wird entsprechend der zwei Aktivitätsmessverfahren und der Antigenbestimmungen in zwei Typen unterteilt. Der häufigere Protein C Mangeltyp 1 beschreibt einen echten Verlust des Proteins im Blutkreislauf aufgrund einer verminderten Synthese oder Stabilität und geht mit einer gleichermaßen erniedrigten Aktivität und Antigenkonzentration einher. Der mit ca. 10-15% der Fälle weniger häufige Typ 2 liegt vor, wenn die Aktivität im Vergleich zur Konzentration deutlich erniedrigt ist. Bei diesem Typ geht man davon aus, dass das Protein im Blut zwar zirkuliert, jedoch zum Teil so verändert ist, dass es seine Funktion nicht suffizient erfüllen kann. Poort et al. sprechen von einem Typ 2-Mangel, wenn das Verhältnis aus Aktivität und Antigen niedriger als 0,67 ist (Poort et al. 1993, Berczky et al. 2010). Überwiegend handelt es sich bei beiden Mangeltypen um einfache Nukleotidsubstitutionen im kodierenden Protein C-Gen, die zu einem Austausch der Aminosäuren führen. Mutationen mit Bildung eines Stop-Codons, im Grenzbereich von Exon und Intron, Deletionen und Insertionen sind sehr viel weniger häufig (Reitsma et al. 1995).

Ein angeborener Protein C-Mangel wird bei ca. 3-5% der Patienten diagnostiziert, die an einer Thrombembolie erkranken (Franco and Reitsma 2001). Dabei handelt es sich in der Regel um tiefe Beinvenenthrombosen und pulmonale Lungenarterienembolien. Typisch sind aber auch Thrombosen an ungewöhnlicher Lokalisation wie proximale Extremitätenvenen oder mesenteriale Venen. Das sehr seltene Krankheitsbild der schweren Purpura fulminans beim Neugeborenen kann bei homozygoten oder kombiniert heterozygoten Protein C-Mangelzuständen auftreten.

Der heterozygote Protein C-Mangel ist in der Normalbevölkerung relativ häufig vorhanden und mit einer Prävalenz zwischen 1 zu 200 bis 300 angegeben (Koster et al. 1995, Matei et al. 2001). Es wird davon ausgegangen, dass ein angeborener Protein C-Mangel, zumindest in seiner heterozygoten Form, kein kritischer

## Einleitung

Risikofaktor für das Ausbilden von klinisch relevanten Thrombosen darstellt. Zu Thrombosen kommt es in der Regel erst dann, wenn der heterozygote Protein C-Mangel mit Umweltfaktoren und / oder anderen genetischer Faktoren kombiniert ist, die ebenfalls ein erhöhtes Risiko darstellen (Rosendaal 1999, Zöller et al. 1999, Miletich 1987). Zu diesen „Umweltfaktoren“ gehören u.a. die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Traumata, operative Eingriffe und Schwangerschaften. Mit ca. 63% Anteil sind die Faktor V-Leiden Mutation und die Prothrombin-Mutation die häufigsten genetische Risikofaktoren einer angeborenen Thrombophilie. Weitere genetische Risikofaktoren sind die Mangelerkrankungen des Protein S und des Antithrombin III, die zusammen mit dem Protein C-Mangel bei ca. 15% der Patienten mit angeborener Thrombophilie entdeckt werden. Auch die Dysfibrinogenämie und die Hyperhomocysteinämie stellen Risikofaktoren dar (Bertina 1997, Zöller et al. 1999, Matei et al. 2001, Smulders and Blom 2011). In aktuellen Studien wurde ein erhöhtes Risiko für arterielle Thrombembolie bei angeborenen Protein C-Mangel festgestellt, so z.B. für Hirninfarkte bei Kindern und Erwachsenen (Folsom et al. 2009, Kenet et al. 2010).

Anfang der 80er Jahre des 20.Jahrhunderts wurde die erste Familie mit einem heterozygoten Protein C-Mangel durch Griffin et al. beschrieben (Griffin et al. 1981). Kurz darauf wurde im Jahr 1983 der erste Fall eines homozygoten Protein C-Mangels bei einem Neugeborenen geschildert, der mit einer schweren Purpura fulminans aufgrund einer mikrovaskulären Thrombosierung assoziiert war (Branson et al. 1983). Derzeit sind ca. 250 Mutationen des Protein C-Gens bekannt, die in verschiedenen Datenbanken zusammengetragen wurden ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk); [www.itb.cnr.it/procmd](http://www.itb.cnr.it/procmd)). Bei bestimmten Mutationen, die sich in örtlich oder geschichtlich miteinander verbundenen Regionen unter nicht miteinander verwandten Individuen häufen, konnte ein ursprüngliches Individuum für diese Mutation ermittelt werden. Dieser Zusammenhang wird als „founder-effect“ bezeichnet. Im Falle von Protein C-Mutationen konnten founder effects z.B. unter niederländischen und finnischen Familien ermittelt werden (Zeegers et al. 2004, Levo et al. 2000).

Die Therapie der tiefen Venenthrombose wird mit einer Kombination aus Heparin (unfraktioniertes Heparin s.c. oder i.v., oder niedrigmolares Heparin s.c.) und Vitamin



K-Antagonisten durchgeführt. Nach Erreichen einer international normalized ratio (INR) von  $> 2$  kann Heparin ausgeschlichen werden. Dies wird in der Regel nach 5 bis 7 Tagen erreicht. Die Vitamin K-Antagonisten sollten bei Vorliegen genetischer Risikofaktoren für ca. 6 bis 12 Monate weiter gegeben werden. Dabei sollte eine INR von 2 bis 3 gehalten werden. Je nach Schwere und Ursache der Thrombose kann die Therapie über einen längeren Zeitraum ausgedehnt werden (z.B. Thromboembolie bei kombinierten genetischen Risikofaktoren) (Büller et al. 2004, Bates et al. 2004).

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

In die Arbeit wurden Patienten eingeschlossen, die einen symptomatischen Protein C-Mangel ohne erkennbare Ursache aufwiesen. An diesen Patienten wurde eine Analyse des Protein C-Gens durchgeführt, um eventuelle Mutationen zu detektieren, die den Protein C-Mangel erklären könnten.

Der Einfluss auf die Struktur des Proteins und die klinische Relevanz sollten für die gefundenen Mutationen durch Literaturrecherche erläutert werden.

Soweit die Möglichkeit bestand, sollten weitere Familienangehörige bei einer nachgewiesenen Mutation auf dieselbe untersucht werden, um eine eventuelle Vererbung dokumentieren zu können.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Im Zeitraum 2004 bis 2007 wurden 13 Patienten auf einen hereditären Protein C-Mangel untersucht. Die Proben und Laborbefunde wurden mit Zustimmung der Patienten oder ihrer Angehörigen im Rahmen diagnostischer Routineuntersuchungen von folgenden Institutionen zur Verfügung gestellt: Frau Dr. med. F. Bergmann (Medizinisches Labor Bremen; Labor Wagner Stibbe, Hannover), Universitätsmedizin Rostock (Abteilung für Hämatologie/ Onkologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin; Abteilung für Gastroenterologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin; Klinik und Poliklinik für Chirurgie; Pädiatrische Kardiologie der Kinder- und Jugendklinik; Universitätsfrauenklinik) und Universitätsklinikum Rechts der Isar (TU München). Dabei fanden Proben von Personen, die eine verminderte PC-Aktivität (koagulometrisch unter 70%) aufwiesen und bei denen keine erworbenen Ursachen für den PC-Mangel zu eruieren waren (Leberfunktionsstörungen, Einnahme von Vitamin K-Antagonisten), Eingang in diese Arbeit.

Für familiäre Untersuchungen von 5 Patienten standen die Blutgruppen ihrer Verwandten zur Verfügung.

### **2.2. Protein C Aktivitäts- und Antigenbestimmung**

Am Gerinnungsautomaten BCS (Data Behring) wird für die routinemäßige Aktivitätsbestimmung die koagulometrische Methode angewendet (ProClot Kit, HemosIL<sup>TM</sup>, Instrumentation Laboratory, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA, USA). Der Referenzbereich für die koagulometrische Messung im Labor der Universitätsklinik Rostock liegt bei 70 bis 140%.

Darüber hinaus stehen für die Typisierung eines Protein C-Mangels sowohl die chromogene Aktivitätsmessung (Berichrom Protein C, Dade Behring Marburg GmbH, Deutschland) wie auch die Antigenbestimmung mit Hilfe des Enzym- Immuno- Assay (Technoclone GmbH) zur Verfügung.

### 2.3. DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung

Für diese Untersuchungen wird EDTA-Vollblut der Patienten verwendet. Die Isolierung der DNA aus Leukozyten erfolgte bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit Hilfe des QIAamp DNA (Blood) Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach folgendem Protokoll:

1. Für die Lyse werden 20µl der Proteaselösung in ein steriles 1,5ml-Eppendorfgefäß vorgelegt. Dies wird mit jeweils 200µl EDTA-Vollblut und 200µl der Pufferlösung AL 15 sec auf einem Vortex (Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Inc.; Bohemia; NY; USA) gemischt.
2. Die Probe wird 10 min bei 56°C inkubiert (Inkubator 1000; Heidolph Elektro GmbH & Co KG; Kelheim).
3. Danach werden 200µl Ethanol (ca. 95%) dazugegeben und das Probenröhrchen für 15 sec auf dem Vortex gemischt. Anschließend wird ein QIAamp Filterröhrchen in das dazugehörige 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und das Probengemisch dazu gegeben. Für 1 min wird die Probe bei 8000 rpm (Biofuge 13, Haeraeus Instruments GmbH, Hanau) zentrifugiert, das Filterröhrchen in ein sauberes 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und das alte Sammelröhrchen samt Inhalt verworfen.
4. Der nun folgende Waschvorgang erfolgt nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffers in das Filterröhrchen, welches anschließend für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert wird. Das Filterröhrchen wird danach wieder in ein sauberes Sammelröhrchen gegeben und das alte Sammelröhrchen verworfen.
5. Im nächsten Schritt werden 500 µl des AW2-Puffers aufgetragen und 3 min bei maximaler Umdrehungszahl (13000 rpm) zentrifugiert.
6. Um die DNA zu eluieren, wird das Filterröhrchen nun in ein steriles 1,5ml-Eppendorfgefäß gesetzt und 100µl des AE-Puffers dazu gegeben. Anschließend wird 1-5 min bei RT inkubiert und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert.

Die Konzentration der DNA wird durch eine photometrische Messung bei 260 nm (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) ermittelt. Dabei sollte die Konzentration zwischen 15 und 60 ng/µl liegen. Des Weiteren ist die Reinheit der Probe über das

Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm festzustellen. Für eine gute DNA-Qualität sollte das Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Die Proben der in der vorgelegten Arbeit untersuchten Patienten erfüllten diese Bedingungen ausnahmslos.

### **2.4. Genotypisierung**

#### **2.4.1. Doppelstrang-Amplifikation**

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion und durch die Verwendung der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer werden die einzelnen Exons des Protein C-Gens vervielfacht.

Für die PCR wurden folgende Thermocycler verwendet: Der Biometra Personal Cycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen), der Tpersonal Kombi Cycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) und der Thermocycler Progen-05 (Techne Limited, Duxford, Cambridge, United Kingdom). Für die PCR-Proben wurde das Taq-PCR-Core-Kit (Qiagen) angewendet. Dieses Kit enthielt den QIAGEN PCR Buffer (10x konzentriert), welcher beinhaltet: Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 8,7 bei 20°C), Q-Solution (5x konzentriert),  $\text{MgCl}_2$  solution (25 mM), dNTP Mix (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und die QIAGEN Taq DNA Polymerase.

Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH) sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In Tabelle 3 ist die Zusammenstellung der PCR-Proben für die Exons 1, 2, 3, 4-5, 6, 7, 8, 9 (5'), 9 (3') aufgeführt. Die PCR-Bedingungen, die den entsprechenden Primern angepasst werden mussten, sind in den Tabellen 4 bis 8 aufgeführt.

## Materialien und Methoden

Exon	Primer	Sequenz 5' - 3'	Nukleotide (Annotation nach Foster 1985)
<b>2</b>	PC-2 A	CCCTTTCATTCCGCTTC	-104, -88
	PC-2 B	GATTCCTGCCATTCCCATC	207, 189
<b>3</b>	PC-3 A	GACAAGACCTCCCCAGGTTCTCCC	1227, 1250
	PC-3 B	AGGGCCAGCATCCTAATCGCTC	1645, 1624
<b>4-5</b>	PC-4-5 A	ATCGGGCGTCGATCCCTGTTTG	2832, 2853
	PC-4-5 B	CCCACCTCCTCTAGGCAGTAATGCG	3386, 3362
	PC-4-5-V	ACCAGCTCCTAGCAGCCAACGA	2808, 2829
	PC-4-5-R	GTTGTCCAGAGAGCAATTGAGGAA	3351, 3328
<b>6</b>	PC-6-F-Reitsma	ATCGGCAGCTTCAGCTGCGA	3160, 3179
	PC-6-R-Reitsma	CTCCCTAGAAACCCTCCTGA	3555, 3536
	PC-6 A	TTGTGTGCGCAGACGGTGACCAGTG	3069, 3092
	PC-6 B	TTCCTCGCTCCCTCCCTAGAAACCC	3566, 3542
	PC-6F-neu	TTGGTCTTGCCCTTGGAGCACC	3094, 3115
<b>7</b>	PC-7 A	ACTGTGGCAAAGTGGCCCAC	6023, 6042
	PC-7 B	TCGGTTTCTGCACCCTGAGC	6355, 6346
<b>8</b>	PC-8-F-Reitsma	CTAAGCCTATGCCCATATGA	7022, 7041
	PC-8-R-Reitsma	AAGAAGCCTCTTGCTTAAGC	7370, 7351
	PC-8 A	AGAAAGGGCTAAGCCTATGCCC	7014, 7035
	PC-8 B	AACCTGAACAGCCTGCCTAGTCCC	7328, 7305
<b>9 (5')</b>	PC-9-5' A	TGAACCTTCTTCAGGCCCTCTGCCC	8266, 8289
	PC-9-5' B	TCATTGTGCGGGACACGGGAATC	8704, 8681
	PC-9-5-V	CAGTGGGTGGGCCTCAGGAAAGT	8308, 8330
<b>9 (3')</b>	PC-9-3' A	TCGCAGACCATAGTGCCCATCTG	8523, 8545
	PC-9-3' B	CCCTTTAATGTCCCATCCATTGCC	9030, 9007

**Tabelle 2:** verwendete Primer; A,F,V: Vorwärtsprimer; B,R: Rückwärtsprimer

## Materialien und Methoden

Reagenzien	Mengen
Qiagen PCR Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl (0 µl bei Exon 6 und 8)
Q-Solution	10 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
Vorwärts-Primer (s. Tabelle 2)	0,5 µl (20 µmol)
Rückwärts-Primer (s. Tabelle 2)	0,5 µl (20 µmol)
DNA	200 ng (100 ng bei Exon 2)
destilliertes Wasser	ad 50 µl

**Tab 3:** Zusammensetzung der 50 µl PCR-Probe für die Doppelstrang-Amplifikation

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in min	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung	94	5	1x
Denaturierung	94	1	30x
Annealing	s. Tabelle 4	1	
Synthese	72	1,5	
Finale Synthese	72	7	1x
Pause	4	∞	

**Tab 4:** PCR-Protokoll für Exon 3, 6, 7, 8, 9 (3')

Exon	Temperatur in °C
3, 7, 9 (3')	62
6	58
8	50

**Tab 5:** Annealing-Phasen für Exon 3, 6, 7, 8, 9 (3')

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in min	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung	94	5	1x
1. Denaturierung	94	1	20x
1. Annealing	s. Tabelle 7	1	
1. Synthese	72	1,5	
2. Denaturierung	94	1	10x
2. Annealing	s. Tabelle 8	1	
2. Synthese	72	1,5	
Finale Synthese	72	7	1x
Pause	4	∞	

**Tab 6:** PCR-Protokoll für Exon 2, 4-5, 9 (5')

Exon	Temperatur in °C
2	62 (jeder Zyklus $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ weniger bis $52^{\circ}\text{C}$ )
4-5, 9 (5')	72 (jeder Zyklus $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ weniger bis $62^{\circ}\text{C}$ )

**Tab 7:** 1. Annealing-Phase für Exon 2, 4-5, 9 (5')

Exon	Temperatur in °C
2	62
4-5, 9 (5')	72

**Tab 8:** 2. Annealing-Phase für Exon 2, 4-5, 9 (5')

Für den Nachweis der Amplifikate wurden 15 µl der Amplifikatprobe mit 3 µl Probenpuffer (Blue/ Orange 6x Loading Dye, Promega) gemischt und 15 µl dieses Gemisches auf das 2,5%iges Agarose-Standardgel aufgetragen. Das Agarose-Standardgel wurde entsprechend der Tabelle 9 zusammengestellt.

Reagenzien	Menge
Gel (Sea Kem LE Agarose/ Cambrex)	2,15 g
TBE-Puffer (10x TBE: 1,0 M Tris; 0,9 M Boric Acid; 0,01 M EDTA/ Invitrogene)	850 ml
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml, Bio Rad )	4 µl
Proben, 100-Basenpaar-Leiter, evtl. Kontrollproben auftragen; bei konstanter 100 Volt Spannung 1 h Laufzeit in 1x TBE-Puffer	

**Tab 9:** Bedingungen für die Gelelektrophorese

Anschließend werden die Amplifikate von anderen Bestandteilen der PCR (z.B. Primer, Nukleotide, Polymerasen, Salze) gereinigt. Hierfür wurde das MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Im Folgenden wird das dazugehörige Protokoll wiedergegeben.

1. Zu 175 µl PB-Puffer werden 35 µl des Amplifikats gegeben und gemischt.
2. Die MinElute-Säule wird in ein mitgeliefertes 2 ml Sammelröhrchen gesetzt, in das die Probe gegeben und anschließend 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert wird (Biofuge 13; Heraeus Instruments GmbH; Hanau).
3. Der Inhalt des Sammelröhrchens wird verworfen, die MinElute-Säule wieder in dasselbe Sammelröhrchen gesetzt, 750 µl PE-Puffer dazu gegeben und wiederum 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert.
4. Der Inhalt des Sammelröhrchens wird wieder verworfen, die MinElute-Säule zurück in dasselbe Sammelröhrchen gesetzt, bei 13000 rpm für 3 min trocken zentrifugiert und anschließend die MinElute-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt.
5. Um die DNA zu eluieren, werden 10 µl destilliertes Wasser auf das Zentrum der Membran (auf der MinElute-Säule) gegeben, die Säule 1 min bei Raumtemperatur stehengelassen und dann für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.



Nach diesem Schritt liegt ein gereinigtes Amplifikat von ungefähr 10 µl vor. Im Folgenden wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Menge einschätzen zu können, die für die nachfolgende PCR verwendet werden soll.

Für diese Gelelektrophorese wurde ein Gemisch aus 2 µl des gereinigten Amplifikats und 2 µl Probenpuffer (5x Loading Dye Solution/ Fermentas) hergestellt, von dem 4 µl auf das Gel aufgetragen wurden. Bei einer sichtbaren Bande kamen für den nächsten Schritt 2 µl gereinigtes Amplifikat zur Anwendung, was aber je nach Bandenstärke in der Gelelektrophorese auf max. 5 µl erhöht wurde.

#### 2.4.2. Einzelstrang-Amplifikation

In dieser PCR wurden der jeweilige Vorwärts- oder Rückwärtsprimer eingesetzt und so vom entsprechenden Exon der Vorwärts- oder Rückwärtsstrang amplifiziert. Die PCR-Proben setzten sich aus dem gereinigten Amplifikat (min. 2 µl), das mit destillierten Wasser auf 5 µl aufgefüllt wird, 1 µl des entsprechenden Vorwärts- oder Rückwärtsprimers (5 µmol) und 4 µl des CEQ DTCS Quick Start Mix (Beckmann Coulter) zusammen.

In Tabelle 10 sind die entsprechenden PCR-Bedingungen wiedergegeben.

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in Sek.	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung	-----	-----	
Denaturierung	96	20	30x
Annealing	50	20	
Synthese	60	240	
Finale Synthese	-----	-----	
Pause	4	∞	

**Tab 10:** PCR-Bedingungen für die Einzelstrang-Amplifikation

Auch diese Amplifikate mussten von den PCR-Reagenzien gesäubert werden. Im Folgenden ist protokollarisch der Verlauf dargestellt:

1. Es wird eine Fällungsreagenz bestehend aus 2 µl 2 M Natriumacetat (Sigma), 2 µl 100 mM EDTA (Sigma) und 1 µl Glykogen (Beckmann Coulter) frisch angesetzt.

2. Die Amplifikatprobe wird mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. In ein Eppendorf Reagenzgefäß werden diese 20 µl Amplifikatlösung, 5 µl der Fällungsreagenz und 60 µl 95%es Ethanol gegeben und gemischt. Die Probe wird anschließend 15 min bei 14000 rpm (Universal 30 RF/ Hettich Tuttlingen) zentrifugiert.
3. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, 200 µl 70%es Ethanol dazugegeben und 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert.
4. Wieder wird der Überstand abgenommen und verworfen, mit 200 µl 70%en Ethanol aufgefüllt und bei 2 min und 14000 rpm erneut zentrifugiert.
5. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei auf die Pellets (gereinigtes Amplifikat) geachtet werden muss.
6. Das Eppendorfgefäß mit dem Pellet wird anschließend bei 40 °C ca. eine Stunde lichtgeschützt getrocknet (Inkubator 1000; Heidolph Elektro GmbH & Co KG).

Nach der Trocknung und der Resuspendierung der Pellets mit jeweils 40 µl SLS-Puffer (Beckmann Coulter) werden die Proben sequenziert.

### **2.5. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Amplifikate fand in einem automatisierten Sequenzer (CEQ<sup>TM</sup> 8000, Beckman Coulter) nach der Methode von Frederic Sanger statt (Sanger et al. 1977) und wurde mit Hilfe der CEQ<sup>TM</sup> 8000 sequence analysis software (Version 7.0.55 und 9.0.25) ausgewertet.

### **2.6. Bestätigung der Mutationen**

Um die Mutationen zu bestätigen, kamen zwei Methoden zum Einsatz, die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse und die Allelspezifische PCR. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einer Gelelektrophorese nach Tabelle 9. Hierzu wurden 15 µl der jeweiligen Probe mit 3 µl Probenpuffer (6x Blue/ Orange Loading Dye) gemischt und 15 µl dieses Gemisches auf das Gel aufgetragen.

Die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse basiert auf der Erkennung der Mutation oder der entsprechenden Wildtypsequenz durch eine Restriktase (Lynas 1997). Diese Methode wurde für die Mutationen R-1L, R15W, E92Stop, R169Q, H211Q, A267P, A267T und M364T angewendet. In den Tabellen 11 bis 18 sind die Protokolle für den jeweilig angewandten Restriktaseverdau zusammengestellt.

Für die Auswertung wurden Restriktaseverdaugemische des Amplifikats mit der Mutation und des Amplifikats vom Wildtyp mit Hilfe der Gelelektrophorese verglichen.

Reagenzien	Mengen in µl
HpyCH4 IV (New England Biolabs Inc.)	0,5 (1 U)
10x NEBuffer 1	2
Amplifikat	10
destilliertes Wasser	7,5
Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert (Inkubator 1000; Heidolph Elektro GmbH & Co KG)	

**Tab 11:** *Protokoll für den Restriktaseverdau für den Nachweis der Mutation R-1L*

Reagenzien	Mengen in µl
Mbi I (Fermentas)	0,5 (5 U)
Puffer Y <sup>+</sup>	2,0
Amplifikat	15,0
destilliertes Wasser	2,5
Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert	

**Tab 12:** *Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation R15W*

## Materialien und Methoden

Reagenzien	Mengen in $\mu\text{l}$
Hae II (New England Biolabs Inc.)	0,5 (1 U)
10x NEBuffer 4	2.0
BSA	0,3
Amplifikat	15.0
destilliertes Wasser	2.2
Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert	

**Tab 13:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation E92Stop

Reagenzien	Mengen in $\mu\text{l}$
Alu I (Pharmacia Biotech)	1,7 (3 U)
10x One-Phor-All Buffer Plus	2,0
Amplifikat	15,0
destilliertes Wasser	1,2
Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert	

**Tab 14:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation R169Q

Reagenzien	Mengen in $\mu\text{l}$
Nsi I (Roche)	0,5 (5 U)
Puffer H	2,0
Amplifikat	15
destilliertes Wasser	2,5
Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert	

**Tab 15:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation H211Q

Reagenzien	Mengen in µl
Aci I (New England Biolabs Inc.)	0,5 (5 U)
10x NEBuffer 3	2,0
Amplifikat	15,0
destilliertes Wasser	2,5
Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert	

**Tab 16:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation A267P

Reagenzien	Mengen in µl
Mwo I (New England Biolabs Inc.)	0,5 (2,5 U)
10x NEBuffer für Mwo I	2,0
Amplifikat	15,0
destilliertes Wasser	2,5
Die Proben wurden 1 Stunde bei 60 °C inkubiert	

**Tab 17:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation A267T

Reagenzien	Mengen in µl
Nco I (New England Biolabs Inc.)	0,5 (5 U)
10x NEBuffer 4	2,0
Amplifikat	15,0
destilliertes Wasser	2,5
Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert	

**Tab 18:** Protokoll für den Restriktaseverdau der Mutation M364T

Für die Mutation R157Q konnte keine entsprechende Restriktase gefunden werden. Der Nachweis wurde deshalb durch eine allelspezifische PCR erbracht. Dafür wurden zwei Rückwärtsprimer so kreiert, dass die vorletzte Base des einen Primers mit dem Wildtyp (Cytosin) und die des anderen mit der Mutation (Thymin) übereinstimmte. Nach der Erstellung dieser Rückwärtsprimer wurden sie zusammen mit dem ursprünglichen Vorwärtsprimer in einer PCR eingesetzt. Zur Bestätigung

## Materialien und Methoden

einer heterozygoten Mutation müsste ein Amplifikat sowohl mit dem Wildtyp-, als auch mit dem Mutations-Rückwärtsprimer entstehen.

In den Tabellen 19 bis 21 werden die Proben und Bedingungen für die PCR und die Rückwärts-Primer zusammengefasst.

Reagenzien	Mengen
Qiagen 5x PCR Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
Q-Solution	10 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl (20 µmol)
Wildtyp- oder Mutations-Primer (s. Tabelle 20)	0,5 µl (20 µmol)
DNA	100 ng
destilliertes Wasser	ad 50 µl

**Tab 19:** Protokoll des PCR-Probenansatzes für die Mutation R157Q

Wildtyp-Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)	TTGGTCTTCTGTGTCTCG
Mutations-Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)	TTGGTCTTCTGTGTCTTG

**Tab 20:** Rückwärtsprimer für die Mutation R157Q

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in min	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung	94	5	
Denaturierung	94	1	30x
Annealing	53	1	
Synthese	72	1	
Finale Synthese	72	5	
Pause	8	∞	

**Tab 21:** PCR-Protokoll für die Mutation R157Q

## Materialien und Methoden

Die Restriktase Aci I führte bei der Mutation A267P zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Somit wurde auch hier versucht, den Nachweis mittels einer allelspezifischen PCR zu erbringen.

Die Tabellen 22 und 24 fassen die Proben und Bedingungen der PCR, die Tabelle 23 die angewendeten Rückwärts-Primer zusammen.

Reagenzien	Mengen
Qiagen 5x PCR Puffer	5 µl
dNTP	0,5 µl
Q-Solution	10 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl (20 µmol)
Wildtyp- oder Mutations-Primer (s. Tabelle 23)	0,5 µl (20 µmol)
DNA	100 ng
destilliertes Wasser	ad 50 µl

**Tab 22:** Zusammensetzung der PCR-Probe für die Mutation A267P

Wildtyp-Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)	TATGGTCTGCGAGAGGGTGGCG
Mutations-Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)	TATGGTCTGCGAGAGGGTGGGG

**Tab 23:** Rückwärtsprimer für die Mutation A267P

PCR-Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in min	Zykluszahl
Anfangsdenaturierung	94	5	
Denaturierung	94	1	30x
Annealing	68	1	
Synthese	72	1	
Finale Synthese	72	7	
Pause	8	∞	

**Tab 24:** PCR-Protokoll für die Mutation A267P

### **3. Ergebnisse**

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden im Rahmen diagnostischer Routineuntersuchungen an 13 Patienten und an 8 Familienangehörigen durchgeführt. Die in die Arbeit wurden Patienten aufgenommen, die eine verminderte koagulometrischen Protein C-Aktivität bei normaler Thromboplastinzeit/ INR-Wert und unter Ausschluss einer APC-Resistenz zeigten. Leider lagen nicht bei allen Patienten eine Eigen- und Familienanamnesen vor, insbesondere bei denen deren Blutproben von externen Ärzten oder Laboratorien zugesandt wurden.

Die Gensequenzenanalyse erfolgte bei den Patienten und den Familienangehörigen an den kodierenden Exonen 2 bis 9 und an deren Exon-Intron-Übergänge. Alle Gensequenzen wurden mit den Referenzdaten nach Foster (Foster et al. 1985) verglichen.

Bei den meisten Patienten wurden neben der Bestätigung der Mutationen durch die Sequenzanalyse des komplementären Stranges weitere Bestätigungsverfahren, wie die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse und die Allelspezifische PCR durchgeführt.

#### **Falldarstellungen**

##### **3.1. Patient 1 (43 Jahre, männlich)**

Im Oktober 2003 stellte sich der Patient erstmals zur molekulargenetischen Abklärung einer bekannten Protein C-Aktivitätsminderung in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Rostock vor. Bei seiner Vorstellung gab er keine antikoagulatorische Medikation an.

Im Dezember 2000 erlitt der Patient im Alter von 40 Jahren eine tiefe Beinvenenthrombose rechts mit konsekutiver beidseitiger Lungenembolie und Infarktpneumonie. Die erweiterte Gerinnungsdiagnostik der Thromboembolie erbrachte eine verminderte Protein C-Aktivität bei normaler Protein C-Konzentration, sodass ein Protein C-Mangel vom Typ 2 anzunehmen war. In der Familienanamnese gab der Patient an, dass sein Vater an einer Lungenembolie verstorben war. Seine 65jährige Mutter gab keine thromboembolischen Ereignisse an.



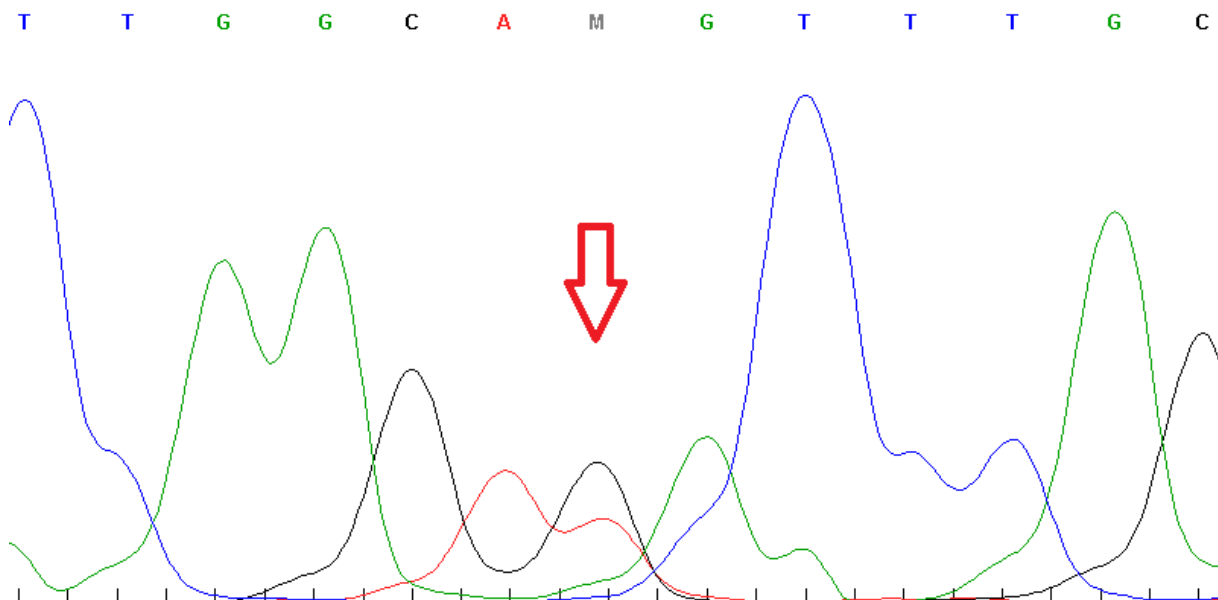
## Ergebnisse

Analyt	27.02.2001	08.08.2003	01.10.2003	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	n.d.	n.d.	98	70 – 130%
Protein C-Aktivität (APTT)	43	42	57	70 – 140 %
Protein C-Konzentration	n.d.	n.d.	114	%

**Tab 25:** Laborbefunde des Patienten 1 aus den Jahren 2001 und 2003.

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung des Protein C-Gens zeigte sich im Nukleotid 1388 eine heterozygote Substitution von Guanin zu Thymin. Diese Substitution geht mit einem Austausch der Aminosäure Arginin (CGT) und Leucin (CTT) an der Aminosäureposition -1 im Exon 3 einher.

Die molekulargenetische Untersuchung der Mutter ergab keinen Nachweis der Mutation R-1L.

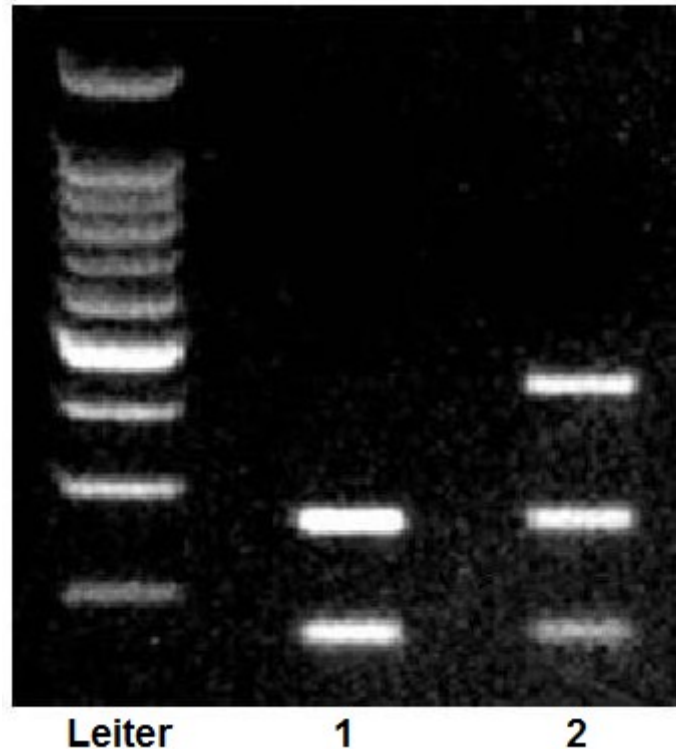


**Abb 1:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Rückwärtsstränge mit der Mutation (M = C+A) des Patienten 1

Die Restriktase HpyCH4 IV spaltet das 419 bp umfassende Amplifikat des Wildtypallels von Exon 3 in zwei Fragmente (160 und 259 bp). Die Mutation

## Ergebnisse

1388G>T verändert die Erkennungssequenz / Spaltstelle für die Restriktase und die Spaltung findet nicht statt. Bei einer Heterozygotie, wie bei diesem Patienten, entstehen somit drei Fragmente (160, 259 und 419 bp).



**Abb 2:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit HpyCH4 IV von Exon 3 bei Patient 1 (1), Wildtyp (2)

### 3.2. Patient 2 (48 Jahre, weiblich)

Die 48jährige Patientin wurde im Februar 2004 wegen anhaltenden Schmerzen im linken Bein in die Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der Universität Rostock aufgenommen. Die Patientin berichtete, dass sie ca. zwei Wochen zuvor einen 5-stündigen Flug unternommen hatte. Sie gab an, keine oralen Kontrazeptiva zu nehmen. Nach Auswertung der körperlichen Untersuchung, der Labordiagnostik und einer Duplexsonographie wurde die Diagnose einer Thrombose der tiefen Unterschenkelvenen und der V. poplitea links gestellt. Bei der Labordiagnostik fiel vor der Antikoagulation eine koagulometrische Protein C-Aktivität von 28% auf. Die Patientin wurde für eine Woche stationär aufgenommen und eine Therapie mit Antikoagulanzen eingeleitet.

## Ergebnisse

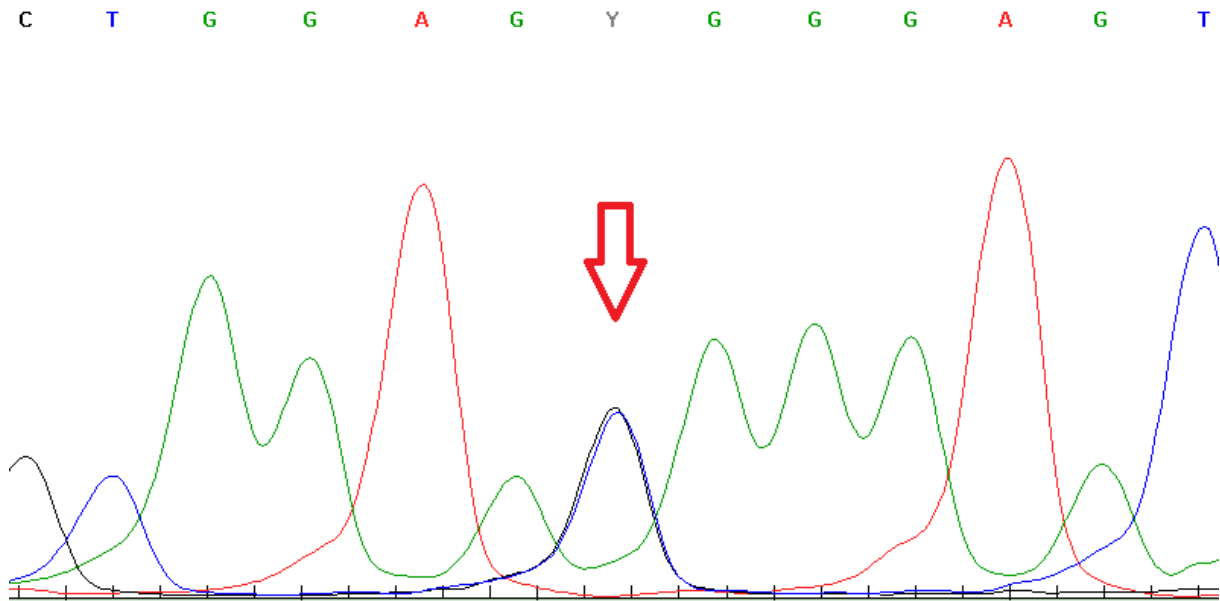
Analyt	20.02.2004	Referenzbereich
INR	93	70 – 130%
Protein C-Akt. (APTT)	28	70 – 140%

**Tab 26:** Befunde der Patientin 2 vom 20.02.2004

Die Familienanamnese ergab, dass die Mutter der Patientin ebenfalls an tiefen Beinvenenthrombosen gelitten hatte und der Vater ihres Mannes mit 80 Jahren an einer Lungenembolie erkrankte. Die beiden Söhne der Patientin wurden im Rahmen der Familienuntersuchung ebenfalls auf einen PC-Mangel hin untersucht. Dabei wurde bei einem der Söhne (Sohn A) eine verminderte PC-Aktivität (koagulometrische Messung: 41%) gemessen.

Bei der Patientin und bei ihrem Sohn A zeigte sich im Nukleotid 1432 eine heterozygote Substitution von Cytosin durch Thymin. An der Aminosäureposition 15 im Exon 3 des mutierten Proteins kommt es somit zu einem Austausch von Arginin (CGG) mit Tryptophan (TGG). Des Weiteren wurde bei Patientin 2 eine heterozygote Substitution von Thymin gegen Cytosin an Nukleotidposition 7228 in Exon 8 entdeckt, die aber zu keiner Änderung der Aminosäure Asparaginsäure an Position 214 führt.

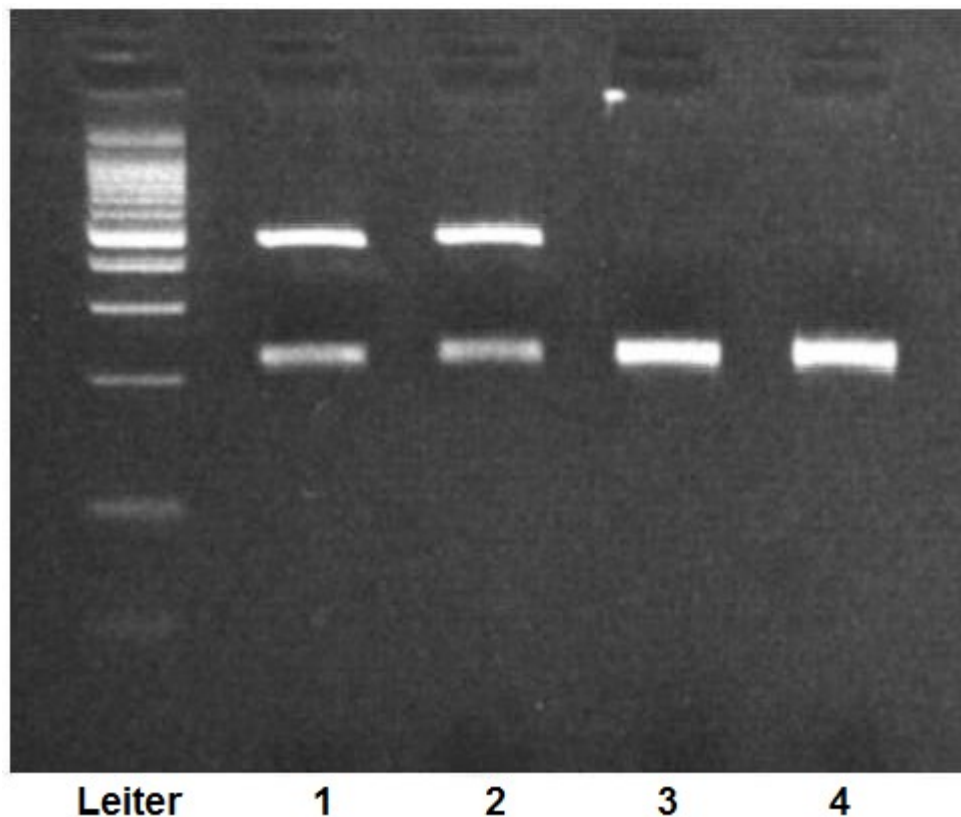
## Ergebnisse



**Abb 3:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $Y = C+T$ ) bei der Patientin 2

Im Rahmen der Amplifikation von Exon 3 des PROC erhält man Amplifikate mit 419 bp. Die Restriktase Mbi I spaltet die Wildtypsequenz in ein 215 bp und ein 204 bp langes Fragment. Die Substitution 1432C>T stört diese Schnittstelle. Eine Homozygotie für das Wildtypallel resultiert in zwei Fragmenten (215 und 204 bp) und eine Heterozygotie in drei Fragmenten (419, 215 und 204 bp). In der Gelelektrophorese (Abbildung 4) wird die heterozygote Substitution bei der Patientin und ihrem betroffenen Sohn deutlich. Die beiden kleineren Fragmente stellen sich wegen ihrer annähernd gleichen Länge als eine Bande dar.

## Ergebnisse



**Abb 4:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Mbi I* von Exon 3 bei der Patientin 2 (1), ihrem Sohn A (2) und ihrem Sohn B (3), Wildtyp (4)

### 3.3. Patient 3 (82 Jahre, männlich)

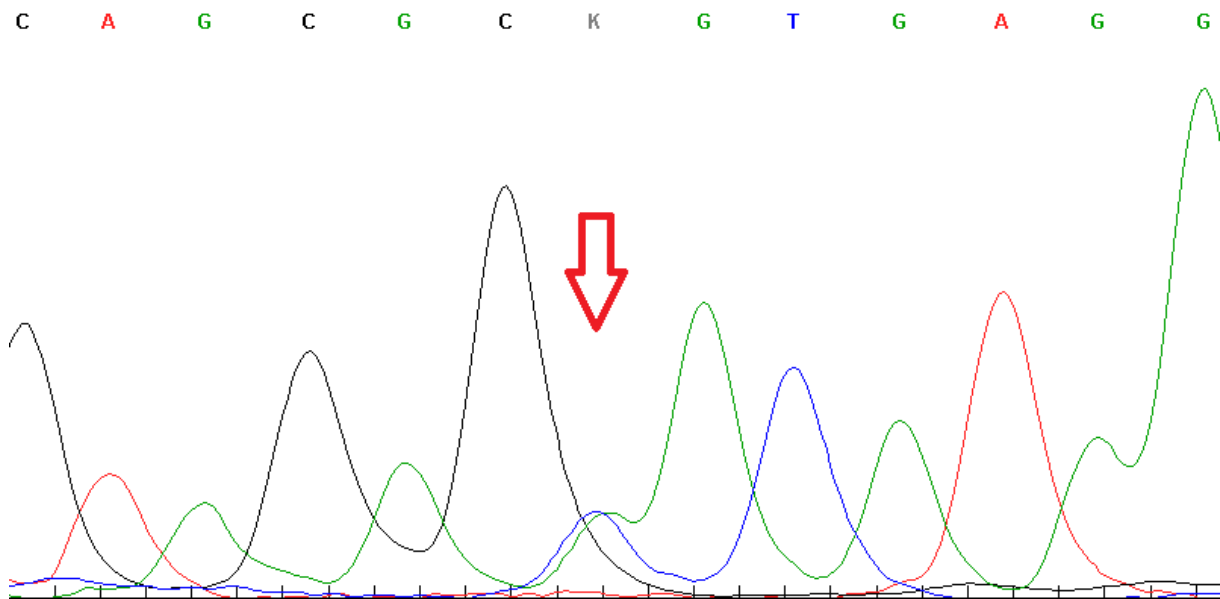
Die Blutproben des 82jährigen Patienten wurden uns im Juni 2006 von Frau Dr. Bergmann (Labor Wagnerstibbe, Göttingen) zur genetischen Analyse zugeschickt. Die Verminderung der Protein C-Aktivität wie auch der Protein C-Konzentration ließ auf einen Protein C Mangeltyp 1 schließen.

Analyt	23.06.2005	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	92	70 – 100 %
Protein C-Konzentration	1.70	2.00 – 3.75 mg/l
Protein C-Aktivität (APTT)	34	70 – 140 %
Protein C-Aktivität (chrom.)	47	70 – 130 %

**Tab 27:** Laborbefunde des Patienten 3 vom 23.06.2005.

## Ergebnisse

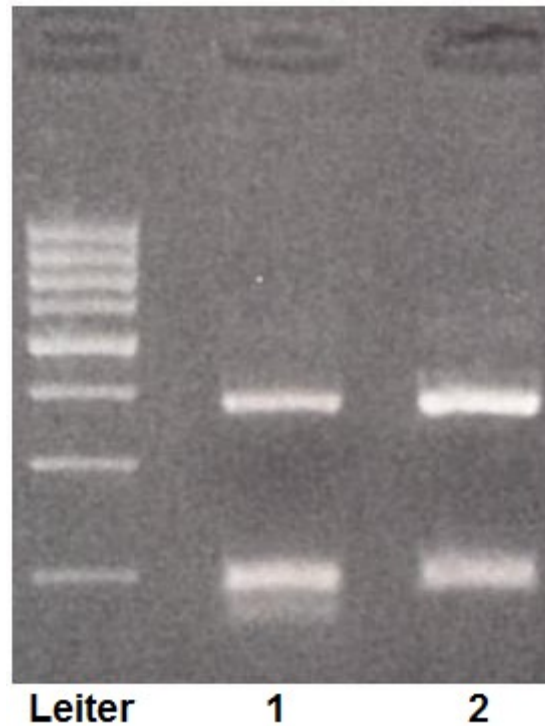
Die molekulargenetische Untersuchung des Protein C-Gens des Patienten zeigte eine Substitution von Guanin gegen Thymin an Nukleotidposition 3217 und dem daraus resultierenden Wechsel der Aminosäure Glutaminsäure (GAG) zu einem Stop-Codon (TAG) an der Aminosäureposition 92 im Exon 5. Auch bei diesem Patienten zeigte sich die bereits oben beschriebene heterozygote Substitution 7228T>C (D214D) in Exon 8.



**Abb 5:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $K = G+T$ ) beim Patienten 3

Das 555 bp umfassende Wildtypamplifikat der Exone 4 und 5 wird durch die Restriktase Hae II in zwei Fragmente (361 und 194 bp) zerlegt. Die Substitution 3217G>T bildet eine neue Schnittstelle, so dass bei Heterozygotie vier Fragmente (170, 191, 194 und 361) entstehen. In der Gelelektrophorese (Abbildung 6) stellen sich die Fragmente 191 und 194 auf Grund der ähnlichen Größe als eine Bande dar.

## Ergebnisse



**Abb 6:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Hae II* von Exon 5 beim Patienten 3 (1), Wildtyp (2)

### 3.4. Patient 4 (34 Jahre, männlich)

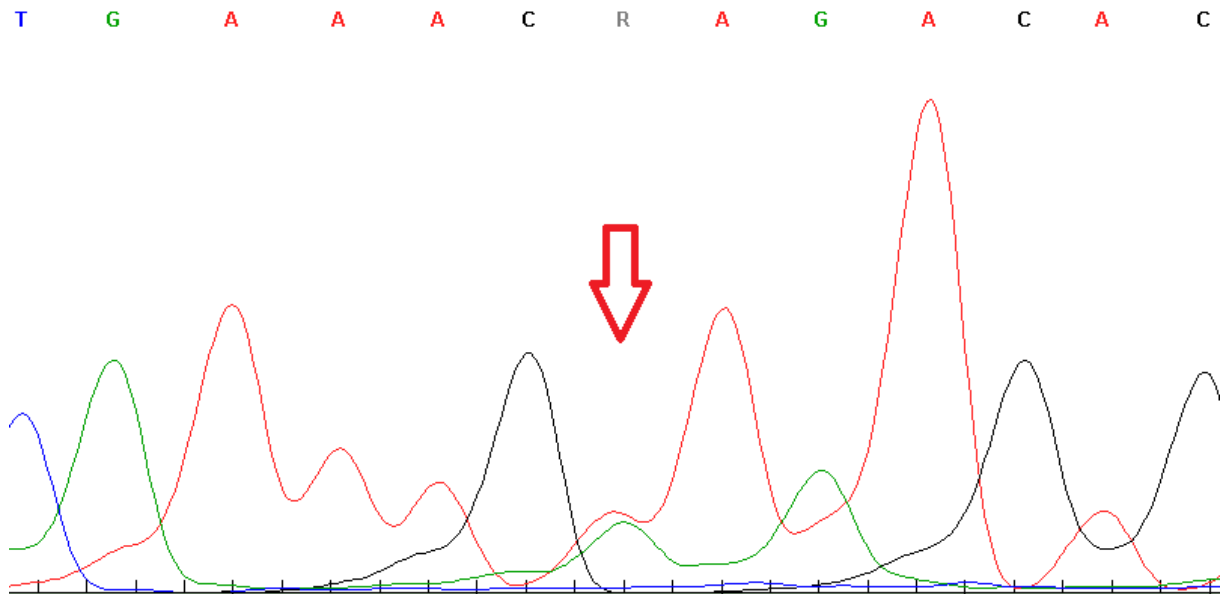
Der 34jährige Patient stellte sich im September 2003 in der ambulanten Sprechstunde der Chirurgischen Universitätsklinik Rostock vor. Er berichtete über seit einer Woche anhaltenden Schmerzen mit begleitender Weichteilschwellung in der linken Schulter, der eine Schwellung der linken Axilla vorausgegangen war. Durch die Duplexsonographie wurde eine Thrombose der linken V. axillaris diagnostiziert. Weiterhin fiel eine Verminderung der Protein C-Aktivität auf. Im Rahmen der Familiendiagnostik stellte sich die 63jährige Mutter in der hämatologischen Ambulanz der Universität Rostock vor. Sie berichtete mit 40 Jahren zwei tiefe Beinvenenthrombosen erlitten zu haben.

Analyt	03.09.2003	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	105	70 – 130%
Protein C-Aktivität (APTT)	45	70 – 140 %

**Tab 28:** Laborbefunde des Patienten 4 vom 03.09.2003.

## Ergebnisse

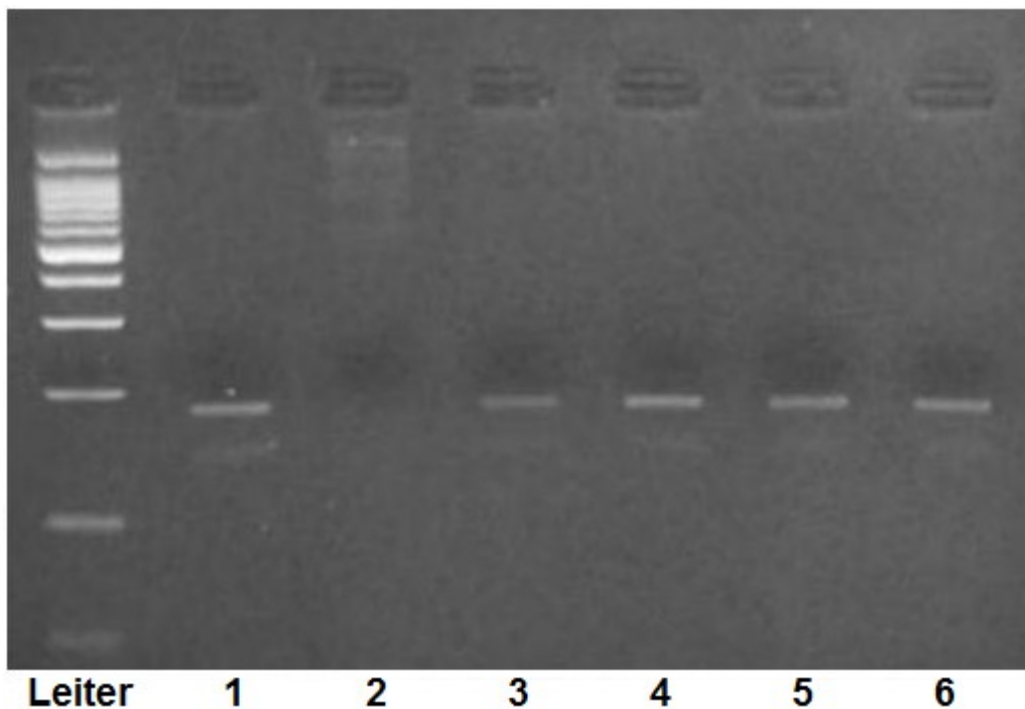
Bei der Analyse des Protein C-Gens stellte sich im Nukleotid 6183 eine heterozygote Substitution von Guanin zu Adenin heraus. Dadurch wird an der Aminosäureposition 157 im Exon 7 Glutamin (CAA) statt Arginin (CGA) in die Polypeptidkette eingesetzt. Die molekulargenetische Untersuchung der Mutter ergab ebenfalls die Mutation R157Q in heterozygoter Ausprägung.



**Abb 7:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $R = G+A$ ) des Patienten 4

Da sich für die heterozygote Substitution des Patienten keine geeignete Restriktase fand, wurde das Verfahren der Allelspezifischen PCR angewendet. Dabei werden die Vorwärtsprimer für Exon 7 mit je zwei neuen Rückwärtsprimern kombiniert, die sich in ihrer vorletzten Position durch die Nukleotide unterscheiden, durch die sich auch Wildtyp und Mutation unterscheiden. Die entstehenden Amplifikate haben eine Länge von 177 bp. Die PCR des Wildtyps würde nur mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer amplifiziert werden und mit dem Mutations-Rückwärtsprimer nicht. Demnach würde sich der Wildtyp in der Gelelektrophorese nur durch eine Bande darstellen. Die PCR mit der heterozygoten Substitution würde durch beide Rückwärtsprimer amplifiziert werden und entsprechend zwei Banden zeigen. Die Abbildung 8 zeigt die Gelelektrophorese nach Allelspezifischer PCR bei Patient 4 und seiner Mutter mit der entsprechenden Verteilung einer heterozygoten Substitution.





**Abb 8:** Gelelektrophorese nach der Allelspezifischen PCR bei Patient 4. 1. Amplifikat des Wildtyps mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer, 2. Amplifikat des Wildtyps mit dem Mutations-Rückwärtsprimer, 3. Amplifikat der Mutter mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer, 4. Amplifikat der Mutter mit dem Mutations-Rückwärtsprimer, 5. Amplifikat von Patient 4 mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer, 6. Amplifikat von Patient 4 mit dem Mutations-Rückwärtsprimer

### 3.5. Patient 5 (männlich)

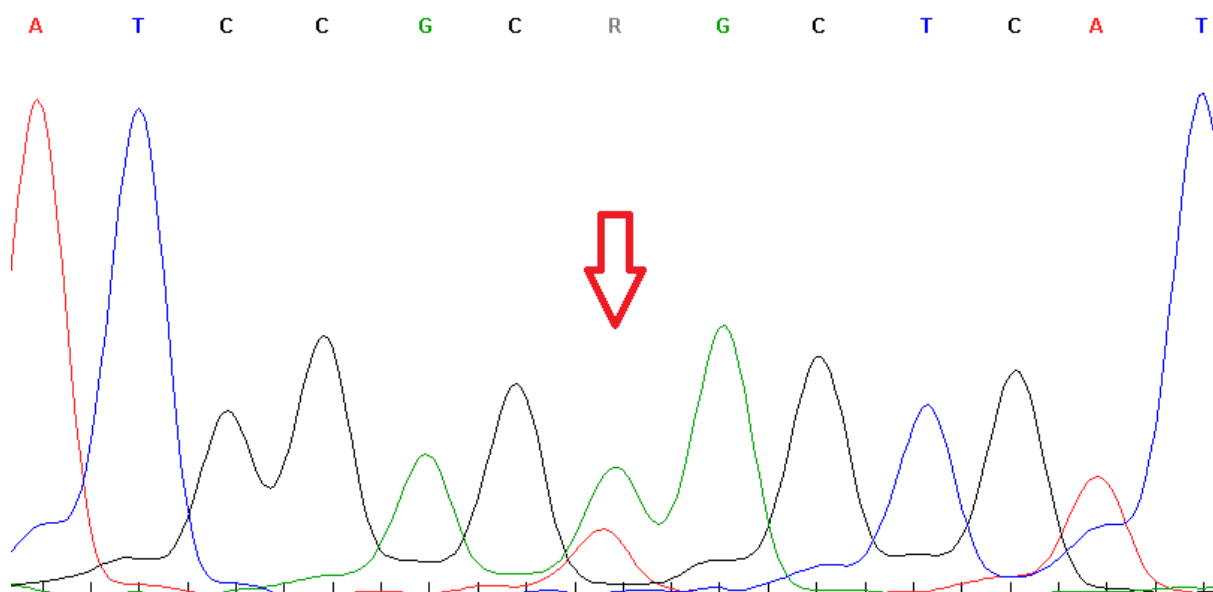
Die Blutproben von Patient 5 wurden uns von Frau Dr. Bergmann zugesandt. Auffällig ist eine verminderte Aktivität und eine verminderte Konzentration des Protein C, vereinbar mit einem Protein C Mangeltyp 1.

## Ergebnisse

Analyt	06.01.2004	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	83	70 – 120 %
Protein C-Akt. (APTT)	51	70 – 140 %
Protein C-Akt. (chrom.)	44	70 – 130 %
Protein C-Konzentration	1.89	2.40 – 3.55 mg/l

**Tab 29:** Laborbefunde des Patienten 5 vom 06.01.2004

Bei diesem Patienten zeigte sich eine heterozygote Substitution von Guanin und Adenin an der Nukleotidposition 6219. Diese Substitution führt zum Austausch der Aminosäure Arginin (CGG) mit Glutamin (CAG) an der Aminosäureposition 169 im Exon 7 von Protein C. Auch bei Patient 5 stellte sich die bekannte heterozygote Substitution 7228T>C in Exon 8 ohne Änderung der Aminosäure Asparaginsäure dar.

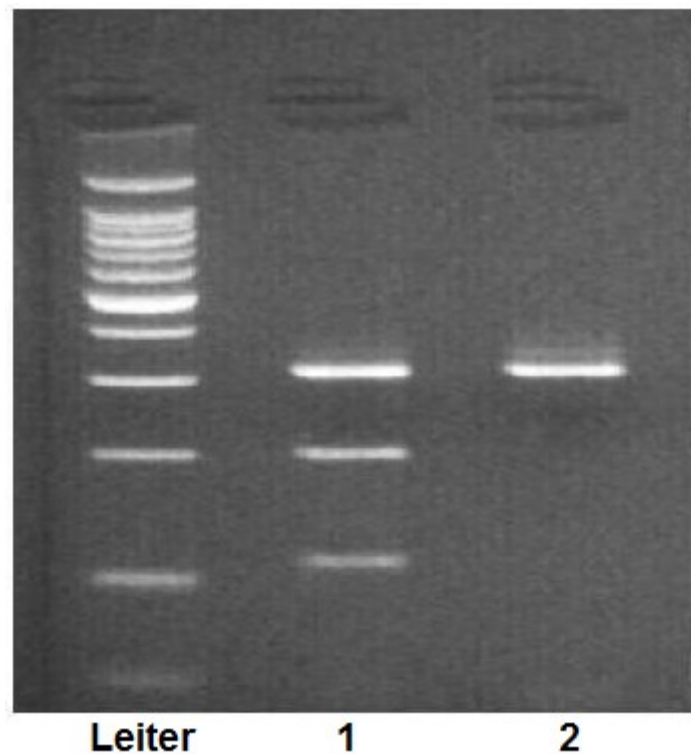


**Abb 9:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $R = G+A$ ) beim Patienten 5

Die Restriktase Alu I spaltet das 333 bp lange Amplifikat des Wildtypallels von Exon 7 in zwei Fragmente (24 und 309 bp). Durch die Substitution 7228T>C entsteht eine weitere Schnittstelle. Eine Heterozygotie stellt sich somit durch vier Fragmente (24 bp, 111 bp, 198 bp und 309 bp) in der Gelelektrophorese dar. Die Fragmente mit 24

## Ergebnisse

bp sind aufgrund ihres Laufverhaltens in Abbildung 10 nur relativ schlecht zu erkennen.



**Abb 10:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Alu I* von Exon 7 bei Patient 5 (1), Wildtyp (2)

### 3.6. Patient 6 (50 Jahre, männlich)

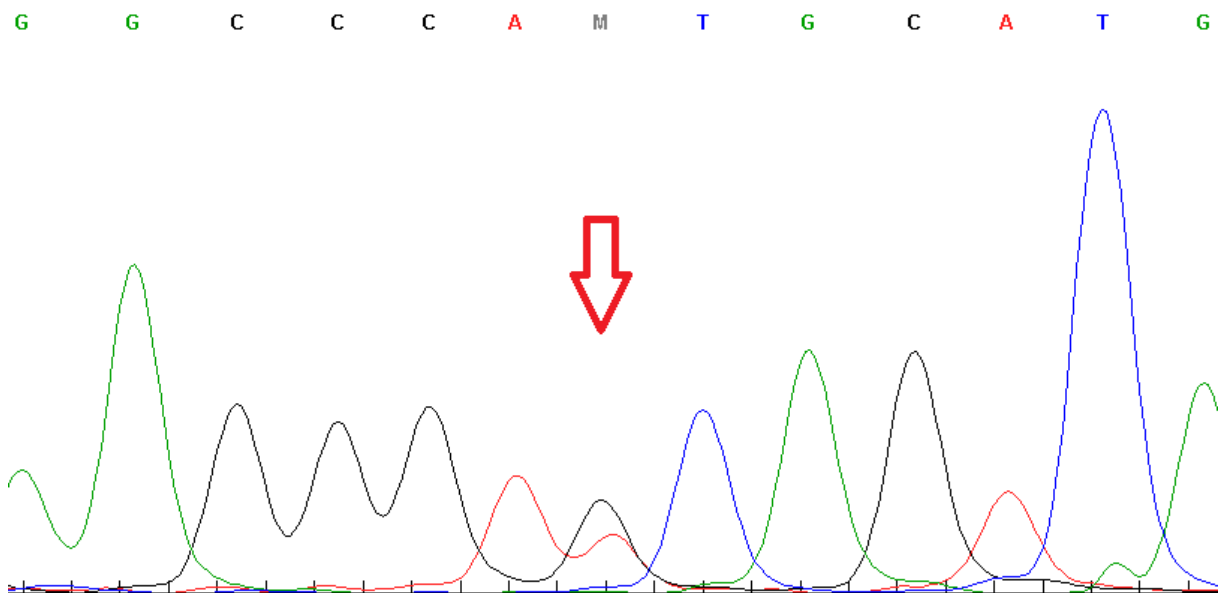
Die Laborwerte des 50jährigen Patienten wurden uns vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie – Klinikum rechts der Isar übersandt. Die Befunde waren im Sinne einer Verminderung der koagulometrischen und der chromogenen Aktivität bei normaler Protein C-Konzentration zu interpretieren. Es handelt sich demzufolge um einen Protein C Mangeltyp 2.

## Ergebnisse

Analyt	16.09.2005	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	117	70 – 120%
Protein C-Antigen	99	%
Protein C-Akt. (APTT)	56	70 – 140 %
Protein C-Akt. (chrom.)	56	70 – 140 %

**Tab 30:** Laborbefunde Patienten 6 vom 16.09.2005.

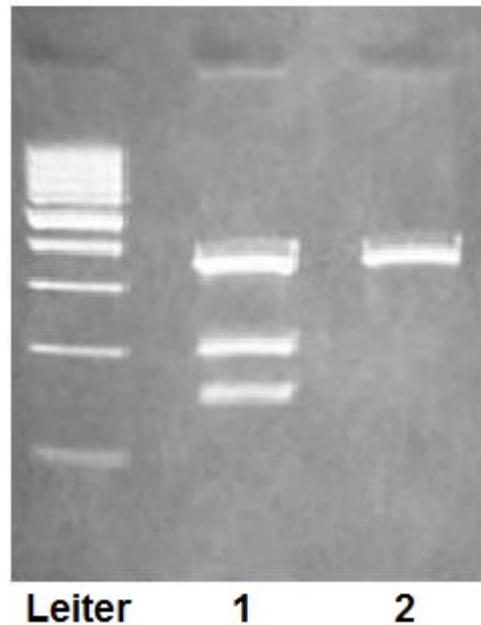
Bei diesem Patienten ergab die Sequenzierung des Protein C-Gens eine heterozygote Substitution von Cytosin gegen Adenin im Nukleotid 7219. Die dadurch beeinträchtigte Aminosäure ist das Histidin (CAC) 211, welche durch ein Glutamin (CAA) ausgetauscht wird. Des Weiteren wurde bei dem Patienten der stille Polymorphismus D214D in homozygoter Ausprägung gefunden.



**Abb 11:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $M = C+A$ ) bei Patient 6

Die Restriktase Nsi I erkennt die Substitution 7219C>A und schneidet das 315 bp lange Exon 8 in zwei Fragmente mit den Längen 210 bp und 105 bp. Wie in Abbildung 12 dargestellt, erscheinen bei dem Patienten drei Banden der oben genannten Längen.

## Ergebnisse



**Abb 12:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Nsi I* von Exon 8 bei Patient 6 (1), Wildtyp (2)

### 3.7. Patient 7

Auffallend am Laborbefund von Patient 7, dessen Blut uns von Frau Dr. Bergmann zugeschickt wurde, waren die verminderten Protein C-Aktivitäten wie auch die verminderte Protein C-Konzentration. Diese Konstellation stellt einen Protein C Mangeltyp 1 dar.

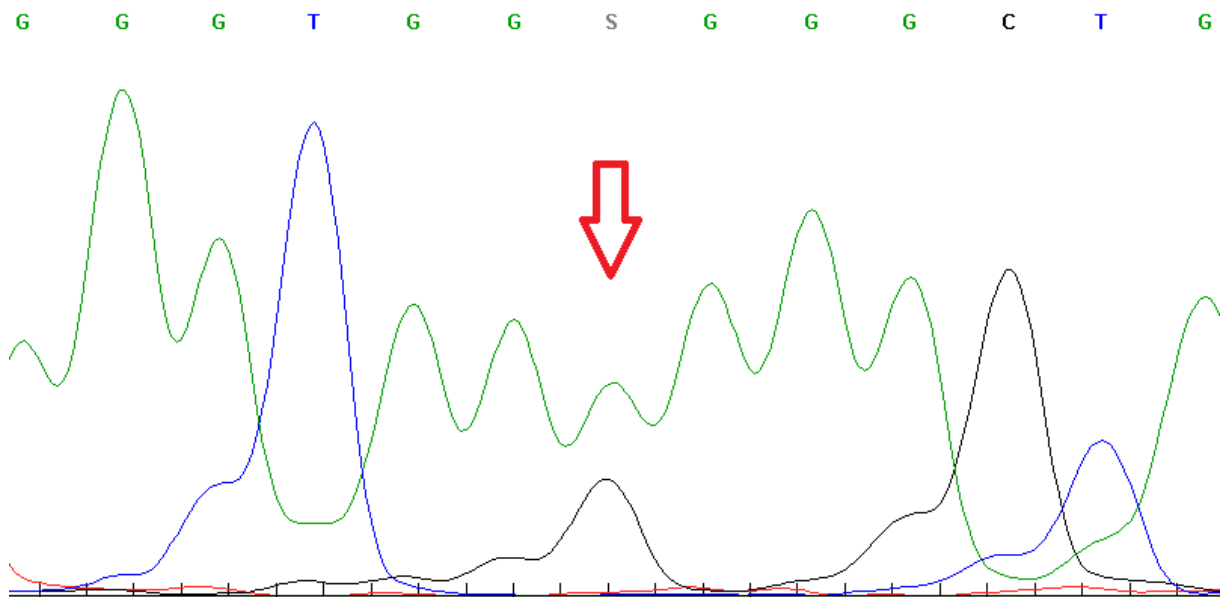
Analyt	11.11.2003	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	77	70 – 120 %
Protein C-Akt. (APTT)	60	70 – 140 %
Protein C-Akt. (chrom.)	46	70 – 130 %
Protein C-Konzentration	0.91	2.00 – 3.75 mg/l

**Tab 31:** Laborbefunde von Patient 7 vom 11.11.2003.

Die Auswertung der Sequenzierung des Patienten ergab eine heterozygote Substitution von Guanin zu Cytosin im Nukleotid 8514. Diese Substitution ändert in Exon 9 an der Aminosäureposition 267 die Aminosäure Alanin (GCC) in Prolin

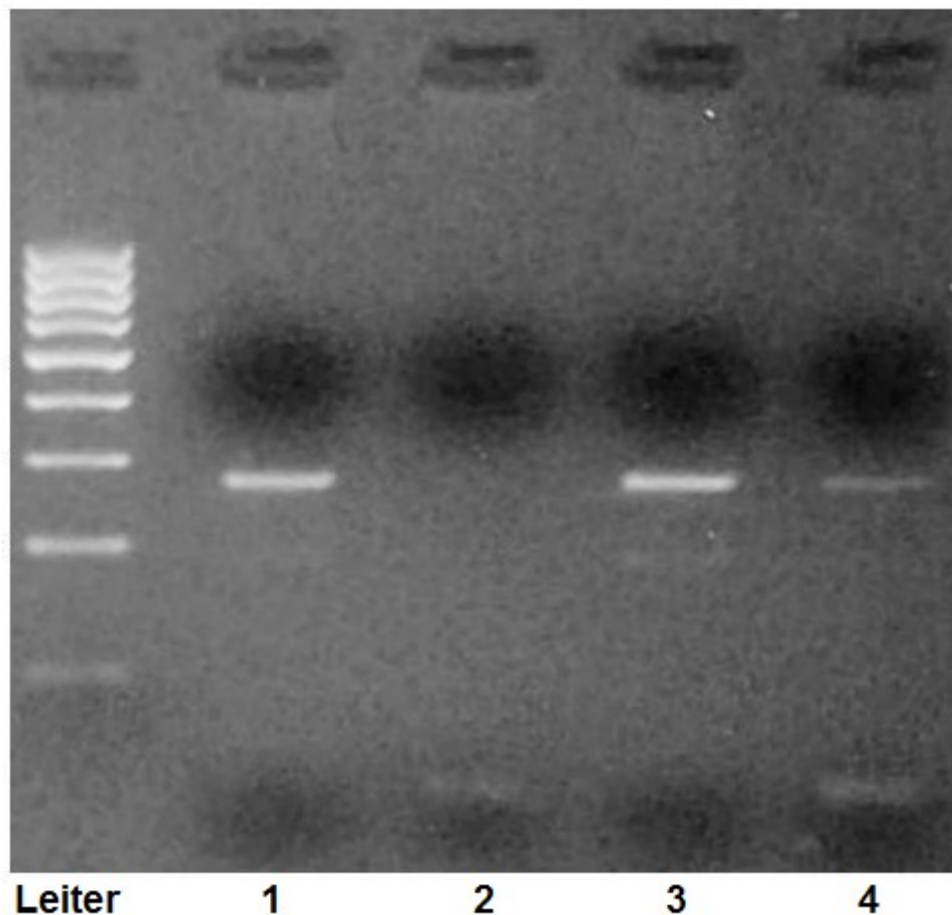
## Ergebnisse

(CCC). Weiterhin wurde bei Patient 7 die bekannte heterozygote Substitution 7228T>C (D214D) in Exon 8 gefunden.



**Abb 13:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Rückwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $S = C + G$ ) von Patient 7

Bei der Substitution 8514G>C musste das Verfahren der allelspezifischen PCR angewendet werden, da sich keine geeignete Restriktase finden ließ. Das 270 bp umfassende Amplifikat des Wildtyps zeigt nur eine Bande bei Amplifikation mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer. Die heterozygote Substitution hingegen zeigt sowohl ein Amplifikat mit dem Wildtyp- als auch mit dem angepassten Mutations-Rückwärtsprimer.



**Abb 14:** Gelelektrophorese nach der Allelspezifischen PCR beim Patienten 7. 1. Amplifikat des Wildtyps mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer, 2. Amplifikat des Wildtyps mit dem Mutations-Rückwärtsprimer, 3. Amplifikat von Patient 7 mit dem Wildtyp-Rückwärtsprimer, 4. Amplifikat von Patient 7 mit dem Mutations-Rückwärtsprimer

### 3.8. Patient 8 (3 Jahre, weiblich)

Die dreijährige Patientin erkrankte im März 2004 an einer Sinusvenenthrombose im Rahmen einer Mastoiditis. Die Blutproben wurden uns von Frau Dr. Bergmann (Labor Wagnerstibbe, Hannover) zur Verfügung gestellt. Untersuchungen des Gerinnungssystems ergaben eine deutliche Reduktion der Protein C-Aktivitäten und der Protein C-Konzentration. Die genetische Untersuchung des Protein C-Gens deckte die homozygote Mutation A267T im Exon 9 auf.

## Ergebnisse

Im Dezember 2004 stellten sich der 26jährige Vater, die 22jährige Mutter und der vierjährige Bruder zu Untersuchungen im Rahmen der familiären Abklärung dieser Mutation vor. Die Eltern sind Cousin und Cousine und stammen aus dem Libanon. Die Familienmitglieder waren Träger der bis dahin asymptomatischen heterozygoten Form der Mutation A267T. Bei den Angehörigen zeigten sich verminderte Werte der Protein C-Aktivitäten und bei der Mutter zusätzlich eine leicht verminderte Konzentration des Proteins C.

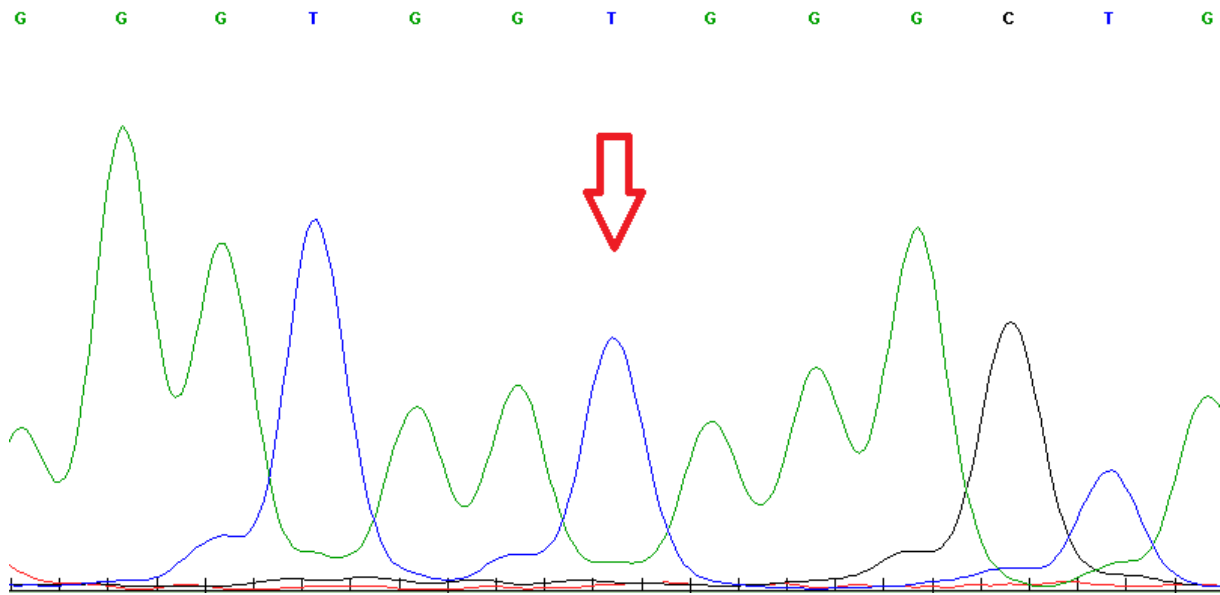
<b>Analyt</b>	<b>Pat. 8</b>	<b>Bruder</b>	<b>Vater</b>	<b>Mutter</b>	<b>Referenzbereich</b>
Thromboplastinzeit	90	98	100	97	70 – 100%
Protein C-Konzentration	0.62	2.11	2.31	1.91	2.00 – 3.75 mg/l
Protein C-Aktivität (APTT)	< 10	48	68	53	70 – 140 %
Protein C-Aktivität (chrom.)	9	55	65	52	70 – 130 %

**Tab 32:** Laborbefunde der Familie von Patientin 8 vom 20.12.2004

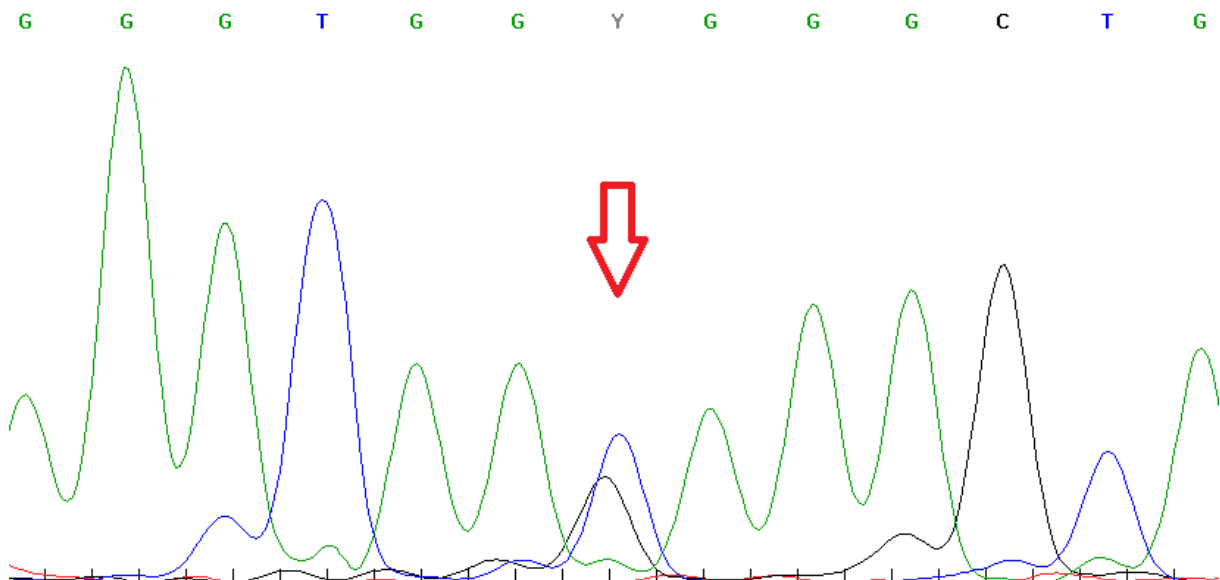
Die Sequenzierung bei der Patientin ergab eine homozygote Substitution von Guanin zu Adenin im Nukleotid 8514. Die Aminosäure Alanin (GCC) an Position 267 wurde durch in die Aminosäure Threonin (ACC) ersetzt. Bei den anderen Familienmitgliedern lag die gleiche Substitution in heterozygoter Ausprägung vor.



## Ergebnisse



**Abb 15:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Rückwärtsstränge mit der homogenen Substitution (T in der Mitte der Sequenz) der Patientin 8

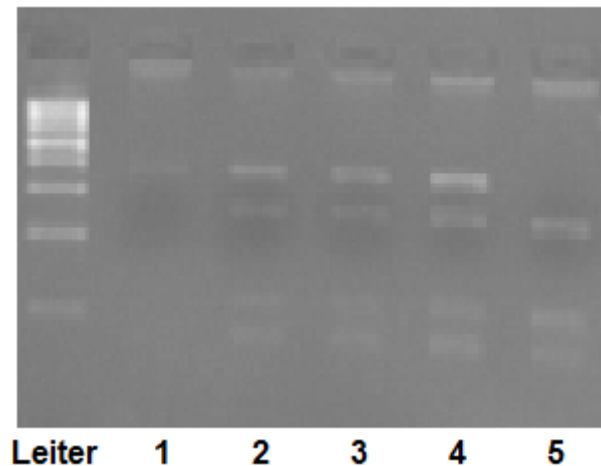


**Abb 16:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Rückwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution ( $Y = C+T$ ) beim Bruder der Patientin 8

Die Restriktase Mwo I erkennt im Wildtypallel zwei Schnittstellen innerhalb des 440 bp lange 5'-Ende von Exon 9. Dadurch entstehen drei Fragmente der Längen 81 bp, 112bp und 247 bp. Die Substitution zerstört die Schnittstelle zwischen den

## Ergebnisse

Fragmenten der Längen 112 bp und 247 bp. Die Banden in der Gelelektrophorese nach dem Restriktaseverdau zeigen somit bei den heterozygoten Mutationsträgern Bruder, Vater und Mutter vier Fragmente (359 bp, 247 bp, 112 bp, 81 bp) und bei dem homozygoten Mutationsträger Patientin 8 zwei Fragmente (359 bp, 81 bp).



**Abb 17:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Mwo I* von Exon 9 (5') bei der Patientin 8 (1), ihrer Mutter (2), ihrem Vater (3) und ihrem Bruder (4) und beim Wildtyp (5)

### 3.9. Patient 9 (32 Jahre, weiblich)

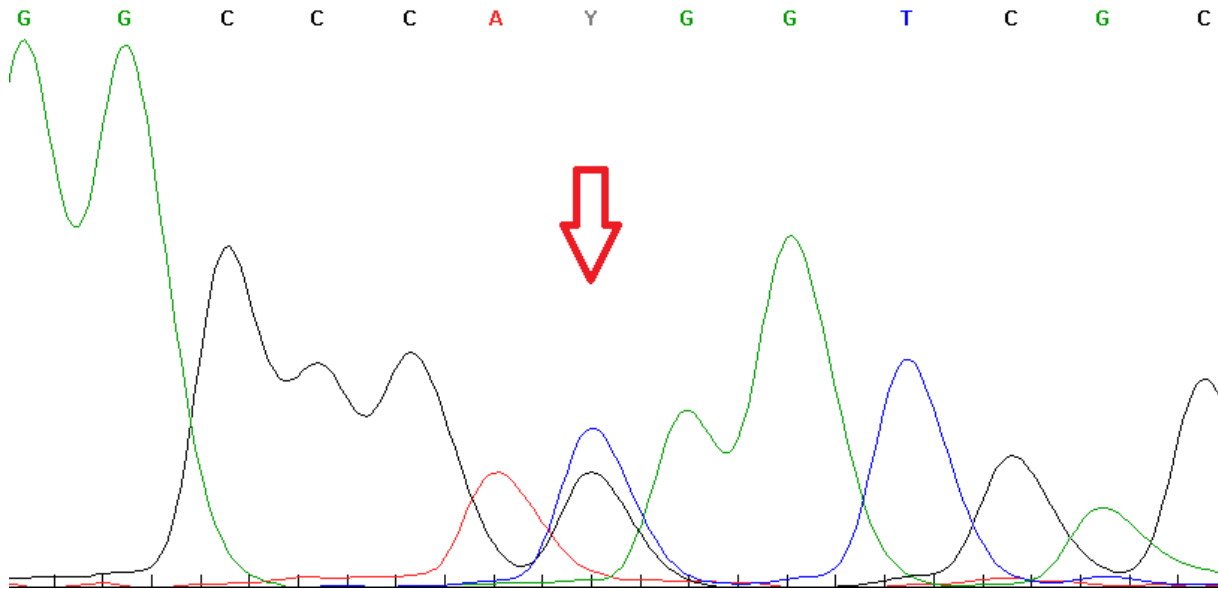
Die Blutproben und Laborbefunde der Patientin wurden uns von Frau Dr. Bergmann zur Verfügung gestellt. Die Labordiagnostik ergab eine relativ zur Protein C-Konzentration deutlichere Verminderung der Protein C-Aktivitäten, was auf einen Protein C Mangeltyp 2 schließen ließ.

Analyt	10.02.2005	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	92	70 – 100 %
Protein C-Konzentration	1.74	2.00 – 3.75 mg/l
Protein C-Aktivität (APTT)	37	70 – 140 %
Protein C-Aktivität (chrom.)	35	70 – 130 %

**Tab 33:** Laborbefunde von Patientin 9 vom 10.02.2005

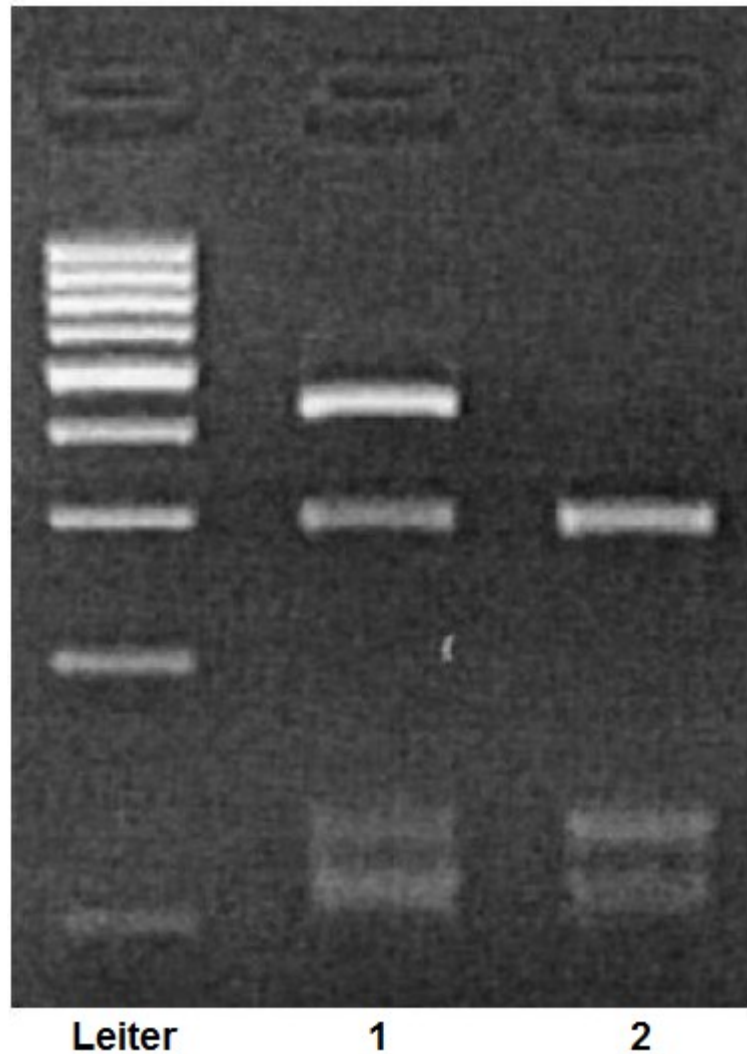
## Ergebnisse

Die Patientin weist eine heterozygote Substitution von Thymin zu Cytosin an der Nukleotidposition 8806 auf, die zu einem Austausch der Aminosäure Methionin (ATG) gegen Threonin (ACG) führt. Diese Mutation befindet sich im Exon 9 an der Aminosäureposition 364.



**Abb 18:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Vorwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution (Y = T+C) bei der Patientin 9

Die Restriktase Nco I spaltet das aus 508 bp bestehenden 3'-Ende von Exon 9 mit der Wildtypsequenz in drei Fragmente (106 bp, 121 bp und 281 bp). Die Substitution zerstört die Erkennungssequenz von Nco I zwischen den Fragmenten der Länge 121 bp. und 281 bp. und führt somit zusätzlich zu einem aus 402 bp bestehenden Fragment.



**Abb 19:** Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit *Nco I* von Exon 9 (3') bei Patient 9, WT: Wildtyp

### 3.10. Patient 10 (44 Jahre, männlich)

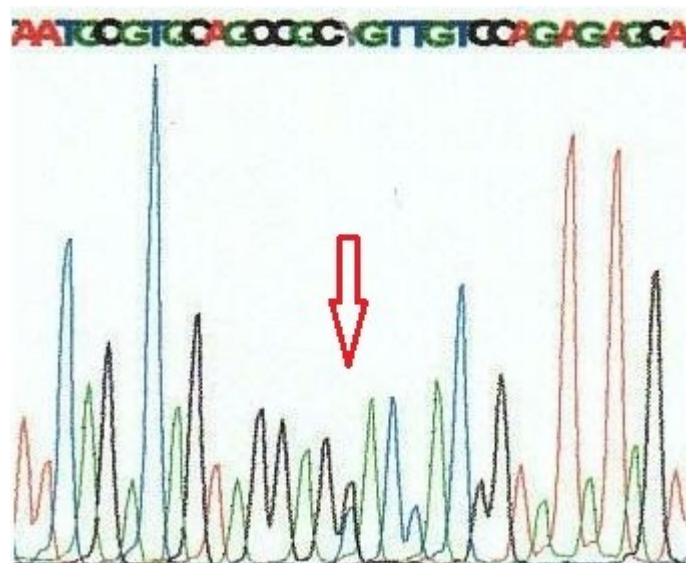
Die Blutproben des Patienten wurden von Frau Dr. Bergmann zur genetischen Analyse zur Verfügung gestellt. Der Patient hatte eine Thrombose erlitten und fiel mit verminderten Protein C-Aktivitäten unter Antikoagulation auf. Im Rahmen der Familienuntersuchung wurde bei der asymptomatischen 16jährigen Tochter ebenfalls eine verminderte Protein C-Aktivität festgestellt. Aufgrund der normalen Werte der Protein C-Konzentration ist in beiden Fällen von einem Protein C Mangel Typ 2 auszugehen.

## Ergebnisse

Analyt	Patient 10	Tochter	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	33	95	70 – 100%
Protein C-Konzentration	2.24	2.83	2.00 – 3.75 mg/l
Protein C- Aktivität (APTT)	18	58	70 – 140 %
Protein C- Aktivität (chrom.)	25	51	70 – 130 %

**Tab 34:** Laborbefunde der Familie von Patient 10 vom 09.02.2005. Der Patient stand unter oraler Antikoagulation.

Bei der molekulargenetischen Analyse des Protein C-Gens fand sich bei dem Patienten und seiner Tochter eine heterozygote Substitution von Guanin zu Adenin an Nukleotidposition 3352. Durch diesen Austausch kommt es zu einem Wechsel der Aminosäure Glyzin zu Serin an Position 103 im Exon 6. Des Weiteren besitzt der Patient die bekannte homozygote Substitution 7228T>C in Exon 8 (D214D). Ein Restriktaseverdau wurde für diese Mutation nicht zusätzlich durchgeführt.



**Abb 20:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierung der Rückwärtsstränge mit der heterozygoten Substitution (Y = T+C) bei Patient 10

### 3.11. Patient 11 (25 Jahre, weiblich)

Die Patientin fiel in der Poliklinik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Rostock durch eine leicht verminderte Protein C-Aktivität auf.

Analyt	26.04.2004	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	92	70 – 130 %
Protein C-Akt. (APTT)	66	70 – 140 %

**Tab 35:** Laborbefunde der Patientin 11 vom 26.04.2004.

Die molekulargenetische Untersuchung der Exone 2 bis 9 und der angrenzenden Exon-Intron-Übergänge bei Protein C ergab keine Substitution.

### 3.12. Patient 12 (15 Jahre, männlich)

Der Patient wurde von der Pädiatrische Kardiologie der Universität Rostock zur molekulargenetischen Analyse bei verminderten Protein C Aktivität vorgestellt.

Analyt	03.06.2004	Referenzbereich
Thromboplastinzeit	84	70 – 130 %
Protein C-Akt. (APTT)	59	70 – 140 %

**Tab 36:** Laborbefunde des Patienten 12 vom 03.06.2004

Die Sequenzierung der Exone 2 bis 9 und der angrenzenden Exon-Intron-Übergänge wiesen keine relevante Substitution auf. Nur die stumme Substitution 7228 T>C im Exon 8 zeigte sich bei diesem Patienten in homozygoten Ausprägung.

**3.13. Patient 13 (29 Jahre, weiblich)**

Die Patientin stellte sich im September 2004 in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universität Rostock zur Gerinnungsdiagnostik vor. Bei ihr war im Juli des gleichen Jahres im Rahmen einer Zwillingsschwangerschaft und der Entwicklung eines HELLP-Syndroms eine verminderte Protein C-Aktivität aufgefallen. Die Familienanamnese ergab, dass die Mutter der Patientin als Mittvierzigerin an einer Lungenembolie erkrankt war. In der Untersuchung vom September 2004 zeigte sich jedoch eine normalisierte Aktivität des Protein C.

<b>Analyt</b>	<b>08.07.2004</b>	<b>14.09.2004</b>	<b>Referenzbereich</b>
Thromboplastinzeit	111	106	70 – 130 %
Protein C-Akt. (APTT)	42	98	70 – 140 %

**Tab 37:** Laborbefunde der Patientin 13 vom 08.07.2004 und 14.09.2004

Die molekulargenetische Analyse des Exon 2 bis 9 und der Exon-Intron-Übergänge von Protein C ergab keine relevante Substitution. Es wurde lediglich die bekannte heterozygote Substitution 7228T>C im Exon 8 ohne Änderung der Aminosäure Asparaginsäure an Position 214 gefunden.

## Ergebnisse

	Individuen	Alter	Klinik	PC-Aktivität (APTT)	PC-Aktivität (chromogen)	PC-Antigen	Genotyp	Phänotyp
<b>1</b>	Pat 1 ♂	43 Jahre	TVT, Lungenembolie	57 %	n.d.	114 %	1388G>T	R-1L
	Mutter	65 Jahre	asymtomatisch	n.d.	n.d.	n.d.	keine	keine
<b>2</b>	Pat 2 ♀	48 Jahre	TVT	28 %	n.d.	n.d.	1432C>T	R15W
	Sohn A	n.d.	asymtomatisch	41 %	n.d.	n.d.	1432C>T	R15W
	Sohn B	n.d.	asymtomatisch		n.d.	n.d.	keine	keine
<b>3</b>	Pat 3 ♂	82 Jahre	n.d.	34 %	47 %	1.70 mg/l	3217G>T	E92Stop
<b>4</b>	Pat 4 ♂	34 Jahre	Thrombose V. axillaris sin.	45 %	n.d.	n.d.	6183G>A	R157Q
	Mutter	63 Jahre	TVT mit 40 Jahren	n.d.	n.d.	n.d.	6183G>A	R157Q
<b>5</b>	Pat 5	n.d.	n.d.	51 %	44 %	1.89 mg/l	6219G>A	R169Q
<b>6</b>	Pat 6 ♂	50 Jahre	n.d.	56 %	56 %	99 %	7219C>A	H211Q
<b>7</b>	Pat 7	n.d.	n.d.	60 %	46 %	0.91 mg/l	8514G>C	A267P
<b>8</b>	Pat 8 ♀	3 Jahre	Sinusvenenthrombose	<10 %	9 %	0.62 mg/l	8514G>A*	A267T*
	Bruder	4 Jahre	asymtomatisch	48 %	55 %	2.11 mg/l	8514G>A	A267T
	Mutter	22 Jahre	asymtomatisch	53 %	52 %	1.91 mg/l	8514G>A	A267T
	Vater	26 Jahre	asymtomatisch	68 %	65 %	2.31 mg/l	8514G>A	A267T
<b>9</b>	Pat 9 ♂	32 Jahre	n.d.	37 %	35 %	1.74 mg/l	8806T>C	M364T
<b>10</b>	Pat 10 ♂	44 Jahre	Thrombose	18 %+	25 %+	2.24 mg/l	3352G>A	G103S
	Tochter	16 Jahre	asymtomatisch	58 %	51 %	2.83 mg/l	3352G>A	G103S
<b>11</b>	Pat 11 ♀	25 Jahre	n.d.	66 %	n.d.	n.d.	keine	keine
<b>12</b>	Pat 12 ♂	15 Jahre	n.d.	59 %	n.d.	n.d.	keine	keine
<b>13</b>	Pat 13 ♀	29 Jahre	HELLP-Syndrom, positive Familienanamnese	42 %	n.d.	n.d.	keine	keine

**Tabelle 38:** Zusammenfassung der relevanten klinischen und genetischen Daten. \* homozygote Ausprägung, alle anderen Mutationen sind heterozygot; + unter Antikoagulation



## 4. Diskussion

Für die Zielsetzung dieser Arbeit, Mutationen im Protein C-Gen zu finden und zu beschreiben, stand entsprechendes Probenmaterial von 21 Patienten zur Verfügung. Ein Teil der Proben wurde auch von externen Kliniken und Praxen zugesandt.

Ergänzende klinische Informationen zu den Patienten lagen allerdings nur zu Patienten aus der Universitätsklinik Rostock vor. Methodisch konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine MLPA-Untersuchungen durchgeführt werden. Diese Methode wird benutzt um große Deletionen oder Duplikationen eines Gens aufzudecken, die bei einer einfachen Sequenzierung, bei der vorrangig nach Punktmutationen gesucht wird, nicht auffallen würden. So wurden zum Beispiel bei Protein S-Mangel Patienten, die keine Punktmutation aufwiesen, mit Hilfe dieser Methode Genabnormalitäten entdeckt (Pintao et al. 2009, Kozłowski et al. 2008).

Für den Nachweis von Mutationen bei Patienten mit verminderter Protein-C-Aktivität wurden die kodierenden Abschnitte des Protein C-Gens und die Exon-Intron-Übergänge sequenziert. Mutationen in der Promotor-Region konnten daher in dieser Arbeit nicht miterfasst werden. In der Literatur gibt es Hinweise für Mutationen in der Promotor-Region, insbesondere an den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (HNF). So beschreiben Miller et al. zwei Mutationen an Position -31 und -32, die in der Bindungsstelle für HNF-3 liegen (Millar et al. 2000).

Die Auswertung der Sequenzierungsprotokolle erfolgte nicht automatisiert, so dass Fehler im Ablesen der Basenpaare nicht ausgeschlossen werden können, jedoch wurden für jedes Exon und die Exon-Intron-Übergänge jeweils die Vorwärtsstränge und Rückwärtsstränge kontrolliert.

Bei den 10 gefundenen Mutationen handelt es sich fast ausschließlich um missense-Mutationen, d.h. Mutationen die mit einem Aminosäureaustausch aufgrund einer einzelnen Nukleotidsubstitution einhergehen. Lediglich bei einem Patienten kam es zu einer nonsense-Mutation an der Aminosäureposition 92. Diese Verteilung entspricht annähernd auch der in der Literatur angegebenen missense-Mutationen mit ca. 70% und der nonsense-Mutationen mit 5-10% (Reitsma et al. 1995, Bereczky et al. 2010).

Von den in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen liegt eine an der Spaltstelle zwischen dem Propeptid und der Gla-Domäne (R-1L). Eine andere liegt innerhalb der

Gla-Domäne (R15W), zwei liegen in der EGF-Domänen des Protein C (E92Stop, G103S). Weitere molekulare Mutationen betreffen die Spaltstelle zwischen leichter und schwerer Kette (R157Q) und die des Aktivierungspeptides (R169Q). Vier Mutationen verteilen sich in der Serinprotease-Domäne, von denen eine Mutation eine der drei Aminosäuren des Aktiven Zentrums betrifft (H211Q, A267T, A267P, M364T). Die Mutationen G103S, A267P und M364T wurden bisher nicht als eigenständige missense-Mutation in der Literatur beschrieben. Die letztgenannte Mutation wurde aber im Rahmen einer frameshift deletion 1999 veröffentlicht (Dávid et al. 1999).

Die Protein C Mangeltypen sind unter den gefundenen Mutationen gering zu Gunsten des Typ 2-Mangels verteilt. Bei zwei Patienten aus dem auswärtigen Kollektiv konnte der Mangeltyp nicht bestimmt werden, da die Protein C-Antigenkonzentration nicht bekannt und auch nicht nachträglich in Erfahrung zu bringen war. Von den acht verbleibenden Mutationen waren drei mit einem Typ 1-Mangel und fünf mit einem Typ 2-Mangel verbunden. Bei dem einzigen homozygoten Mutationsträger in dieser Arbeit wurde trotz deutlich erniedrigter Antigen- und Aktivitätswerte ein Typ 2 Mangel errechnet. In der Literatur wird der Typ 2-Mangel mit einer Häufigkeit von 10-15% unter den Mutationen angegeben (Bereczky et al. 2010).

Der stille Polymorphismus D214D wurde bei neun Patienten und Familienangehörigen (Patienten 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 13 und der Tochter von Patient 10) nachgewiesen (Tsay et al. 1994).

### **4.1. Patient 1**

Die Ursache für die verminderte Aktivität des Protein C bei Patient 1 ist eine heterozygote Substitution von Guanin gegen Thymin im Nukleotid 1388. Durch diesen Austausch wird die Aminosäure Arginin an Position -1 durch die Aminosäure Leucin ersetzt. Die Mutation R-1L wurde 2001 erstmals von Simioni et al. beschrieben. Es wurden noch weitere Mutationen beschrieben, die diese Aminosäureposition betreffen. Es handelt sich dabei um die Mutationen R-1H

## Diskussion

(Gandrille et al. 1995, Lind et al. 1997), R-1C (Girolami et al. 1993) und R-1S (Miyata et al. 1995).

Die Aminosäureposition -1 ist im Exon 3 kodiert und gehört zum Propeptid, das zwischen dem Signalpeptid und der Gla-Domäne von Protein C liegt und im Golgi-Apparat abgespalten wird (McClure et al. 1992). Die funktionelle Bedeutung des Propeptides liegt darin, dass es die Erkennungssequenz für die  $\gamma$ -Carboxylase beinhaltet (Suttie et al. 1987; Foster et al. 1987). Die  $\gamma$ -Carboxylierung der Glutaminsäurereste in der Gla-Domäne ist für das Protein von essentieller Bedeutung. Dadurch kann die Domäne in Kontakt mit Calciumionen treten, ihre Struktur ändern und mit Phospholipidoberflächen interagieren.

Simion et al. fanden im Blut ihrer Patientin zwei verschiedene veränderte Aminosäuresequenzen des Protein C. Die eine Sequenz war am N-terminalen Ende durch die Aminosäure Leucin an Position -1 erweitert, die andere wies das komplette Propeptid ab Position -24 auf. Die Ursache für diese erweiterten Sequenzen ist in der Bildung einer alternativen Erkennungssequenz für die Propeptidase (Arg<sup>-5</sup> – Ile – Arg – Lys<sup>-2</sup>) aus der ursprünglichen (Arg<sup>-5</sup> – Ile – Arg – Lys – Arg<sup>-1</sup>) und damit einer Versetzung der Spaltstelle für die Propeptidase zu sehen (Lind et al. 1997). Die neue Spaltstelle Lys<sup>-2</sup> – Leu<sup>-1</sup> ersetzt die originale Spaltstelle Arg<sup>-1</sup> – Ala<sup>+1</sup>. Die Spaltstelle Lys<sup>-2</sup> – Leu<sup>-1</sup> scheint aber weniger effizient zu sein, da ca. 60% des mutierten Moleküls mit dem kompletten Propeptid vorlagen (Simioni et al. 2001). Die übrigen Mutationen R-1H, R-1S und R-1C zeichneten sich ebenso durch die Erweiterung des aminoterminalen Endes durch die entsprechenden Aminosäure aus, es wurden aber nur wenige (R-1H) oder keine (R-1S, R-1C) Proteinvarianten mit dem kompletten Propeptid nachgewiesen (Lind et al. 1997, Miyata et al. 1995, Girolami et al. 1993). Vermutlich stört die hydrophobe Aminosäure Leucin die Erkennung durch die Propeptidase oder sie stellt ein sterisches Hindernis für die katalytische Effizienz des Enzyms dar (Simioni et al. 2001). Die vielen Mutationen an der Position -1 können durch das Vorhandensein eines CpG-Dinukleotids erklärt werden. Die CpG-Dinukleotide sind als Hotspots für Mutationen bekannt (Reitsma et al. 1995; Cooper et al. 1988).

## Diskussion

Bei Patient 1 lag wie auch in den in der Literatur beschriebenen Fällen der Mutationen R-1L, R-1S, R-1H und R-1C ein Typ 2 Protein C-Mangel vor. Dieser Mangeltyp spricht zwar einerseits für ein funktionsfähiges katalytisches Zentrum des Protein C, andererseits aber für eine Störung in der Interaktion mit den Substraten (Protein S, FVa, FVIIIa) oder für eine veränderte Interaktion mit Phospholipidmembranen, für die beim Protein C insbesondere die Gla-Domäne zuständig ist. Weitere Untersuchungen der Gruppe um Simioni et al. zeigten, dass zwar die Aktivierung des mutierten Moleküls ungestört ablief, die Interaktion mit dem aktivierten Faktor V und den Phospholipidmembranen aber gestört war. Da  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Antikörper nicht an das mutierte Protein banden, liegt die Annahme nahe, dass entweder eine Störung der  $\gamma$ -Carboxylierung oder eine inkorrekte Faltung der Gla-Domäne vorliegt. Gegen eine Störung der  $\gamma$ -Carboxylierung spricht sowohl der fehlende Nachweis der PTH-Glutamin Derivate an Position 7, 8 und 15 der Gla-Domäne nach der Edman-Reaktion als auch der Umstand, dass die  $\gamma$ -Carboxylierung im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, also früher als die Propeptid-Abspaltung im Golgi-Apparat. Auch die Mutationen R-1S und R-1H wurden als „normal carboxyliert“ beschrieben. Des Weiteren wurde die Proteinvariante durch  $\alpha$ -Thrombin in aktiviertes Protein C umgewandelt. Eine Inaktivierung vom aktivierten Faktor V durch die Proteinvariante konnte ausgeschlossen werden. Simioni et al. postulierten daher eine Behinderung der korrekten Faltung der Gla-Domäne durch die zusätzliche Aminosäure am aminoterminalen Ende, wodurch die Bindung zwischen Protein C und seinen Substraten oder den Phospholipidoberflächen behindert wurde.

Zum gleichen Schluss kam auch die Gruppe um Miyata et al., welche die Mutation R-1S untersuchte. In Proben mit dieser Mutation ließ sich nur die um eine Aminosäure erweiterte Proteinvariante nachweisen. Somit kann man davon ausgehen, dass durch den Austausch von Arginin an Position -1 mit Serin eine vollwertige alternative Spaltstelle für die Propeptidase entsteht. Bei der Mutation R-1C kommt der besondere Umstand hinzu, dass das zusätzliche aminoterminale Cystein im Plasma Disulfidbrücken mit  $\alpha_1$ -Mikroglobulin bildet und dadurch die Funktionalität einschränkt (Wojcik et al. 1996).

Zusätzlich zu der Blutprobe des Patienten 1, lag auch eine Probe der Mutter vor, in der die Mutation nicht nachgewiesen wurde. In der Familienanamnese war auffällig, dass der Vater 2003 an einer Lungenembolie verstorben war. Somit besteht die

Möglichkeit, dass die Mutation entweder vom Vater ererbt oder spontan entstanden ist.

### 4.2. Patient 2

Der Grund für den Protein C-Mangel bei Patientin 2 ist ein Austausch von Cytosin gegen Thymin an der Nukleotidposition 1432. Diese heterozygote Substitution führt zum Wechsel der Aminosäuren Arginin gegen Tryptophan an der Aminosäureposition 15 des Proteins. Die Mutation R15W wurde schon mehrfach beschrieben (Millar et al. 1993, Reitsma et al. 1995, Lind et al. 1995, Thariath et al. 1997). An dieser Position befinden sich auch die Mutationen R15Q (Gandrille et al. 1994) und R15G (Mimuro et al. 1993).

Die Aminosäure Arginin<sub>15</sub> befindet sich in der Gla-Domäne des Protein C. Die Gla-Domäne ist nach den  $\gamma$ -carboxylierten Glutaminsäureresten benannt und ist essentiell für die Interaktion von Protein C mit Phospholipidmembranen. Durch die Bindung der Gla-Reste mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zu einer Konformationsänderung der Gla-Domäne, die eine Voraussetzung für die Interaktion mit Phospholipidoberflächen ist. Die Protein C-Sequenz L/V-E-R15-E ist bei Säugetieren hoch konserviert. Dieser Umstand spiegelt die Bedeutsamkeit dieser Sequenz wieder.

Thariath et al. beschrieben in ihrer Arbeit die strukturellen und damit funktionellen Veränderungen des Protein C durch die Mutationen R15G, R15Q und R15W. Die posttranslationalen Modifikationen, insbesondere die Spaltung des Dipeptids K156-R157, die  $\gamma$ -Carboxylierung und die  $\beta$ -Hydroxylierung der Mutanten waren hierbei offensichtlich nicht verändert. Jedoch kam es entweder zu einer direkten Störung in der Ca-Bindung und/ oder zu einer Störung der Ca-abhängige Konformation der Gla-Domäne. Das wurde in einer gestörten Interaktion der Gla-Domäne mit Phospholipidmembranen deutlich. Aufgrund der Analyse eines Modells der Gla-Domäne lassen sich die Störung von zwei Ionenbindungen zwischen R15 und Gla<sub>16</sub> als strukturelle Ursache für die erwähnten Störungen identifizieren. Zur weiteren Destabilisierung der Gla-Domäne kommt es durch die Auflösung einer zwischen R15 und H10 befindlichen Wasserstoffbindung.

Die Patientin 2 zeigte bei der koagulatorischen Aktivitätsmessung einen deutlich erniedrigten Wert von 25%. Der Sohn A hat ebenfalls eine erniedrigte koagulatorische Aktivität in Höhe von 41%. Eine genaue Bestimmung des Mangeltyps war nicht möglich, da weder eine chromogener Aktivitätsmessung noch eine quantitative Antigenmessung vorlag. In der oben genannten Arbeit von Thariath wurde bei den R15-Mutaten eine deutlich verminderte koagulatorischen Aktivität (8-15% ex vivo im Verhältnis zum Wildtyp) bei gleich bleibender amidolytischer/chromogener Aktivität sowie eine Einschränkung der Interaktion der Mutanten mit FV/FVa und FVIII/FVIIIa beschrieben. Steinkamp et al. beschreiben 2002 einen Fall mit einer homozygoten Mutation C1432T (R15W). In diesem Fall lagen eine koagulatorische Aktivitätsminderung auf 1-3%, eine chromogene Aktivitätsminderung auf 30% und eine Verminderung der Antigenkonzentration auf 30% vor. Steinkamp et al. beschreiben diesen Mangel als Kombination aus Typ 1 und Typ 2.

Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass ein dysfunktionales Protein C vorliegt, dessen aktives Zentrum zwar funktionsfähig ist (Verhältnis chromogene Aktivität zu Antigen = 1), dessen Interaktion mit dem übrigen Gerinnungssystem aber offensichtlich durch eine gestörte Interaktion der Gla-Domäne mit Ca-Ionen eingeschränkt ist. Des Weiteren zeigen der Fallbericht von Steinkamp et al. wie auch die Arbeit von Tokunaga et al., dass ein Teil des dysfunktionalen Proteins vermutlich nicht sezerniert bzw. frühzeitig abgebaut wird.

Durch die molekulargenetische Untersuchung der beiden Söhne konnte die gleiche Mutation bei dem Sohn A, der ebenfalls einen Protein C-Mangel aufwies, nachgewiesen werden. Somit ist eine Vererbung zwischen den beiden Generationen sehr wahrscheinlich. Auch bei dieser Mutation liegt ein als Hotspot für Mutationen bekanntes CpG-Dinukleotid vor (Reitsma et al. 1995; Cooper et al. 1988).

### **4.3. Patient 3**

Die Ursache für den Typ 1-Mangel bei Patient 3 ist eine heterozygote Substitution von Guanin gegen Thymin im Nukleotid 3217. Dadurch bildet sich ein Stopcodon anstelle der Aminosäure Glutaminsäure an der Aminosäureposition 92. Diese Mutation ist Bestandteil der internationalen Datenbank der Protein C-Mutationen (<http://www.itb.cnr.it/procmd/>).

Die Position 92 liegt in dem Bereich, in dem beide EGF-ähnlichen Domänen von Protein C aneinander grenzen. Diese sind für die Interaktion von Protein C mit Protein S und Thrombomodulin von Bedeutung. Die drei Nukleotide, welche die Position 92 im Protein C-Gen verschlüsseln, liegen genau im Grenzbereich von Exon 5 zu Exon 6. Die Glutaminsäure 92 ist wegen ihrer funktionellen Bedeutung bei Säugetieren hoch konserviert.

Bei der Mutation E92Stop handelt es sich um eine nonsense-Mutation. Durch das neu geschaffene Stopcodon wird die Translation an Position 91 angehalten und es entsteht ein Polypeptid ohne Serin-Protease-Domäne. Also besitzt diese Protein C-Variante keinerlei Funktion und wird vermutlich schon intrazellulär abgebaut. Dafür spricht die deutlich verminderte Antigenkonzentration bei dem Patienten.

Ein weiterer Grund für die durch diese Mutation ausgelöste Gerinnungsstörung könnte ihre Lage zwischen den Exons 5 und 6 sein. Die Substitution C3216T führt zu der Mutation R91R mit einem Typ 1-Mangel. Hierbei liegt eine Mutation in der Konsensussequenz vor, die für den Spleißvorgang benötigt wird. Das Heraustrennen der Introns und Zusammenfügen der Exons ist ein komplexer Vorgang, der bei Mutationen in der Konsensussequenz, wie bei der „stummen“ Mutation R91R, gestört wird und zu fehlerhaften Transkripten führt (Gandrille et al. 1995; Lind et al. 1993). Auch bei der Mutation R91P wird die gerinnungsstörende Wirkung durch eine Störung im Spleißvorgang erklärt (Alhenc-Gelas et al. 2000).

#### **4.4. Patient 4**

Die heterozygote Substitution von Guanin durch Adenin im Nukleotid 6183 führt bei Patient 4 zu einem Protein C-Mangel. Durch diese Substitution kommt es zum Austausch der Aminosäure Arginin mit Glutamin an Position 157 des Protein C. Diese Mutation wurde bereits beschrieben (Greengard et al. 1994), ist aber nicht Teil der internationalen Datenbank der Protein C-Mutationen (<http://www.itb.cnr.it/procmd/>). Eine weitere Mutation wurde an der Position 157 beschrieben, R157Stop, die zu einem verkürzten Protein führt (Poort et al. 1993, Dávid et al. 1999).

Um das Protein C von seiner einsträngigen Form in die doppelsträngige Form zu überführen, wird im Golgi-Apparat das Dipeptid L156-R157 durch eine Endopeptidase gespalten. Die einsträngige Form bildet ca. 10-15% des zirkulierenden Protein C und besitzt im Vergleich zur doppelsträngigen Form eine deutlich eingeschränkte Aktivität. Die Mutation R157Q führt zu einer veränderten Spaltstelle für die Endopeptidase Furin, die diese nicht mehr erkennt und deswegen nicht spaltet (Greengard et al. 1994). In der Arbeit von Greengard et al. ist diese Mutation als Auslöser für einen Protein C Typ 2-Mangel beschrieben. Bei Patient 4 liegt die verminderte Aktivität bei 45%. Es ist davon auszugehen, dass das Protein in seiner einsträngigen Form weitgehend sezerniert wird, da es in dieser Form auch bei gesunden Menschen vorkommt. Der Protein C-Mangel wird damit im Wesentlichen durch die eingeschränkte Funktion der einsträngigen Form erklärt.

Eine molekulargenetische Analyse bei der Mutter ergab ebenfalls das Vorliegen der heterozygote Mutation R157Q. Also wurde die Mutation in diesem Fall von der Mutter auf den Sohn übertragen.

### **4.5. Patient 5**

Die heterogene Substitution von Guanin gegen Adenin im Nukleotid 6219 ist bei Patient 5 die Ursache für den Austausch von Arginin mit Glutamin an der Position 169 des Protein C. Die Mutation R169Q wurde bereits von Poort et al. 1993 beschrieben und ist Bestandteil der internationalen Datenbank der Protein C-Mutationen (<http://www.itb.cnr.it/procmd/>). An dieser Position befindet sich auch die bereits publizierte Mutation R169W (Matsuda 1988, Greengard et al. 1994).

Das Dipeptid Arg169 – Leu170 wird durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex während der Aktivierung von Protein C gespalten. Durch das dabei frei werdende Aktivierungspeptid wird Protein C aktiviert. Dieser Schritt ist somit essentiell für die Bildung eines funktionsfähigen Proteins. Die Aminosäure Arginin an Position 169 bildet mit der Aminosäure Glutaminsäure an Position 163 eine, die lokale Struktur stabilisierende Ionenbindung. Die Mutation R169Q destabilisiert das Aktivierungspeptid durch die Auflösung dieser Ionenbindung (Greengard et al. 1994). Dadurch kann das Aktivierungspeptid nicht mehr vom Thrombin-Thrombomodulin-Komplex oder Thrombin allein erkannt und aktiviert werden (Poort et al. 1993,



Greengard et al. 1994). Die Mutation R169W destabilisiert ebenfalls das Aktivierungspeptid durch die Auflösung der beschriebenen Ionenbindung, bringt jedoch zusätzlich die Aminosäure Tryptophan in die Struktur. Die hydrophoben Eigenschaften dieser Aminosäure stören die Struktur zusätzlich.

Bei dem hier diskutierten Patienten liegt ein Protein C Mangeltyp 1 vor, da das Verhältnis aus Protein C-Aktivität und Protein C-Antigenkonzentration mehr als 0,67 beträgt und bei durchschnittlich 0,75 liegt. Poort et al. diagnostizierte bei seinem Patienten mit der R169Q-Mutation einen Typ 2-Mangel mit einem Verhältnis von 0,63. Bei beiden Patienten liegt sowohl eine deutliche Verminderung der Aktivität, als auch der Protein C-Konzentration vor. Soweit keine Messfehler vorliegen, scheint die Menge an dysfunktionalen Protein C mit der Mutation R169Q im Blut einer deutlichen Schwankung zu unterliegen. Bei Patient 5 wurde offensichtlich weniger dysfunktionales Protein C aus den Hepatozyten sezerniert oder das dysfunktionale Protein beschleunigt abgebaut.

Die Mutation R169W wird auch in anderen Arbeiten sowohl als Protein C Mangeltyp 1 als auch 2 beschrieben (Greengard et al. 1994; Miyata et al. 1994). Masao Naito et al. 2003 zeigten an der Mutation R169W, dass die veränderte Konformation im Protein C-Molekül zu einem gestörten Transport innerhalb des trans-Golgi Netzwerk zur Zelloberfläche führt. Infolgedessen kommt es zu einem vermehrten intrazellulären Abbau, der neben der gestörten Sekretion für die geringen Mengen des Proteins im Blut verantwortlich ist.

### **4.6. Patient 6**

Bei Patient 6 kommt es zu einem Austausch von Cytosin gegen Adenin an der Nukleotidposition 7219. Diese Mutation betrifft die Aminosäure Histidin an der Position 211, die dadurch in Glutamin überführt wird. Poort et al. hat die Mutation H211Q 1993 beschrieben. Die Aminosäure Histidin 211 ist wie auch die Aminosäuren Asparaginsäure 257 und Serin 360 Teil der katalytischen Triade von Protein C. Diese katalytische Triade ist essentiell für die Aktivität von Serinproteasen.

Der durch die Mutation C7219A bedingte Austausch der funktionell wichtigen AS Histidin an der Position 211 führt somit zu einer starken Verminderung bzw.

Aufhebung der katalytischen Aktivität (Greengard et al. 1994). Die funktionelle Gruppe des Glutamins hat nicht die besonderen dissoziablen Eigenschaften des Histidins. Beide Aminosäuren besitzen eine polare Seitenkette, die beim Histidin leicht basisch und beim Glutamin neutral ist. Die Mutation entfaltet ihre gerinnungsrelevante Störung demnach mehr aus funktioneller, denn aus struktureller Sicht, was sich auch im Typ des Protein C-Mangels zeigt. Der Patient der Arbeitsgruppe um Poort wurde als Typ 2-Mangel beschrieben. Bei Patient 6 wurde ebenfalls ein Typ 2-Mangel festgestellt. In beiden Fällen ist die Protein C-Konzentration nicht vermindert, so dass von einer ungestörten Sekretion des Proteins auszugehen ist. Eine Degradierung innerhalb der Zelle aufgrund großer Konformationsänderungen bleibt aus. Durch die Zerstörung der katalytischen Triade ist das Protein direkt in seiner enzymatischen Aktivität gestört, was sich in verminderten Aktivität sowohl im aPTT-System als auch in der chromogenen Messung zeigt.

### **4.7. Patienten 7 und 8**

Patient 7 weist eine heterozygote Substitution des Guanin gegen Cytosin an Position 8514 auf. Der Austausch dieser beiden Basen führt dazu, dass an Position 267 statt dem ursprüngliche Alanin, die Aminosäure Prolin gesetzt wird. Diese Mutation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Patientin 8 zeigt eine homozygote Substitution, Mutter, Vater und Bruder eine heterozygote Substitution von Guanin zu Adenin ebenfalls an der Nukleotidposition 8514. Diese Substitution führt jedoch zum Austausch von Alanin mit Threonin an der Aminosäureposition 267. Die Mutation wurde in der Literatur beschrieben (Greengard et al. 1994) und zusätzlich für die Position 267 die Mutation A267V (Alhenc-Gelas et al. 2000).

Die Position 267 liegt in der Serinprotease-Domäne von Protein C, die das katalytische Zentrum des Proteins enthält. Dieses Zentrum wird von drei Aminosäuren gebildet, von denen Asp257 relativ nahe an Position 267 liegt. Mit den Aminosäuren Val185, Leu200, Val221, Leu238 und Ile273 bildet Ala267 einen hydrophoben strukturellen Cluster. Die Aminosäure Prolin ist für ihren störenden Einfluss auf Polypeptidstrukturen bekannt, der sich insbesondere in einem Aufbrechen von  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen zeigt. Der Austausch der

Aminosäure Alanin mit Threonin führt zu „Ausgleichsbewegungen“ im Cluster, die übergeordnete Strukturen, wie die nahe  $\beta$ -Faltblattstruktur stören und somit die Architektur der Serinprotease-Domäne ändern (Greengard et al. 1994). Tjeldhorn et al. untersuchten die Ursache für die verminderte Sekretion der Protein C-Mutation A267T. Demnach wird die in ihrer Konformation gestörte Protein C-Mutante zu großen Teilen nicht aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert. Somit ist hauptsächlich der intrazelluläre Transport des mutierten Proteins gestört, die direkte intrazelluläre Degradierung spielt dabei im Gegensatz zu anderen Protein C-Mutationen eine untergeordnete Rolle (Tjeldhorn et al. 2010). Anders ist es bei der Mutation S270L, die nur drei Aminosäuren weiter liegt. Diese Mutante unterliegt hauptsächlich der zellulären Degradierung, die für die reduzierte Sekretion verantwortlich ist (Lind et al. 2001).

Auf die zweite in der Literatur erwähnte Mutation A267V gehen Alhenc-Gelas et al. in ihrer Publikation nicht weiter ein; ihr wird eine fragliche schädigende Wirkung im Sinne einer Gerinnungsstörung zugesprochen.

Die heterozygote Mutation bei Patient 7 führt zu einem Typ 1-Mangel. Die Familienmitglieder von Patientin 8 besitzen eine heterozygote Mutation und einen Protein C-Mangel Typ 1. Die homozygote Variante bei Patientin 8 führt zu einem niedrigeren Wert der Protein C-Aktivität als der Protein C-Konzentration. Somit errechnet sich ein Protein C Mangeltyp 2, jedoch sind beide Werte bei Patientin 8 im Gegensatz zu den heterozygoten Familienmitgliedern deutlich erniedrigt. Das bedeutet, dass durch eine Mutation an Position A267 die Architektur der Polypeptidkette so gestört wird, dass das Protein entweder nicht sezerniert oder im rasch degradiert wird (Greengard et al. 1994).

### **4.8. Patient 9**

Im Protein C-Gen von Patient 9 wurde eine heterozygote Substitution von Thymin gegen Cytosin an der Nukleosidposition 8806 diagnostiziert. Dadurch wird an der Position 364 die Aminosäuren Methionin gegen Threonin ausgetauscht. Diese Mutation ist bisher nicht beschrieben worden. Die Mutation M364I wurde als Protein Osaka 2 von Miyata et al. 1994 gefunden und im gleichen Jahr von Greengard et al.

1994 strukturell analysiert. In der Arbeit von David et al. 2000 wurde an Position 364 ein Austausch mit der Aminosäure Tryptophan erwähnt. Dieser Patient hatte eine weitere Mutation, die zu einem Stopcodon an Position 378 führte.

Die Aminosäure Methionin 364 liegt innerhalb der Serinprotease-Domäne. Sie liegt in unmittelbarer Nähe zur Position Serin 360 die neben Histidin 211 und Asparaginsäure 257 das aktive Zentrum des Proteins bildet. Der Austausch der Aminosäure Methionin durch Threonin führt wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung dieses Zentrums. Dafür spricht die deutliche und etwa gleich hohe Verminderung sowohl der koagulatorischen (37%) als auch der chromogenen Aktivität (35%) bei Patient 9. Miyata et al. vermuten, dass die Aminosäure Methionin aufgrund der hohen Konservierung unter den Säugetieren auch eine wichtige strukturelle Aufgabe hat. Dies wird in der Arbeit von Greengard et al. mit einer Analyse der Mutation M364I untermauert. Die Mutation M364I stört eine dichte strukturelle Verbindung zwischen Ile323, Thr295, Val297, Val375 und Tyr393 und führt somit zu einer Verformung der  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Im Gegensatz zu der Arbeit von Miyata et al. wurde bei Patient 9 der Typ 2-Mangel diagnostiziert. Die Aktivität war im Verhältnis zur Protein C-Konzentration deutlich erniedrigt (Aktivitäten-Antigen-Verhältnis: 0,59).

### **4.9. Patient 10**

Bei Patient 10 und seiner Tochter wurde die Ursache für den Protein C-Mangel in einer heterogenen Substitution von Guanin gegen Adenin an der Nukleotidposition 3352 gefunden. Hierdurch kommt es zu einem Wechsel in der Aminosäureposition 103 von Glyzin zu Serin. Diese Mutation wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Eine andere beschriebene Mutation an dieser Position, G103R, ist Teil der Datenbank der Protein C-Mutationen (<http://www.itb.cnr.it/procmd/>, Tsay et al. 1993).

Die bei Wirbeltieren stark konservierte Aminosäure Gly103 liegt in der EGF2-Domäne von Protein C. Diese Domäne ist eine relativ stabile Region zwischen der EGF1-Domäne und dem Aktivierungspeptid, die keinen größeren Änderungen während der Modifikationen von Protein C ausgesetzt ist (Perera et al. 2000). Es bestehen mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der EGF2-Domäne und

der Serinprotease-Domäne wie auch zur EGF1-Domäne. Diese Verbindungen werden von den Aminosäurepositionen 101, 102, 107, 108 und 109 gebildet und liegen somit in relativer Nähe zur Position 103 (Perera et al. 2000). Glycin ist die kleinste Aminosäure und wie die durch eine Kohlenwasserstoffeinheit und eine Hydroxylgruppe erweiterte Aminosäure Serin neutral. Möglicherweise werden durch die Aminosäure Serin eine oder mehrere der umgebenden Verbindungen zur Serinprotease-Domäne gestört, so dass es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt, wodurch die Aktivität vermindert wird. Eine schwerwiegende Störung der Proteinstruktur liegt offensichtlich nicht vor, da der Mangeltyp 2 diagnostiziert wurde und das Protein C in normalen Mengen im Blut zirkuliert. Eine andere Situation liegt bei der Mutation G103R vor. Bei dieser mit einem Protein C Mangeltyp 1 in Verbindung zu bringenden Mutation, führt die sehr viel größere und basisch geladene Aminosäure Arginin zu Änderungen in der Proteinstruktur, so dass das Protein entweder nicht sezerniert oder frühzeitig abgebaut wird.

### **4.10. Patienten 11, 12 und 13**

Bei den drei Patienten wurden keine Mutationen in den kodierenden Abschnitten des Protein C-Gens und den Exon-Intron-Übergängen gefunden. Die Patientin 11 hatte eine Protein C-Aktivität von 66%. Die untere Grenze der Aktivität liegt bei 70%, so dass bei der bekannten Schwankungsbreite der Aktivitäten auch eine Normvariante möglich wäre. Die Aktivität von Patientin 13 normalisierte sich wieder, so dass trotz der bemerkenswerten Familienanamnese am ehesten von einer Veränderung im Rahmen der Schwangerschaft und/ oder des HELLP-Syndroms auszugehen ist. Da keine Untersuchung der Promotor-Region und keine MLPA-Analyse durchgeführt wurden, können bei diesen drei Patienten relevante Mutationen bzw. größere Deletionen / Duplikationen dennoch nicht ausgeschlossen werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Protein C stellt ein Schlüsselenzym im Gerinnungssystem dar. Mit seinen Kofaktoren Faktor V und Protein S inaktiviert es die aktivierten Faktoren V und VIII und behindert damit die Bildung von Thrombin. Seit Ende der 70er Jahre ist das Gen des Protein C entschlüsselt und seit dieser Zeit wurden ca. 250 verschiedene Mutationen entdeckt, die zu einem angeborenen Protein C-Mangel mit dem erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse führen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Suche und Beschreibung von Mutationen des Protein C-Gens, die zu einem angeboren quantitativen oder funktionellen Mangel führen. Dazu standen Blutproben von 13 Patienten und ihren Familienangehörigen zur Verfügung. Bei 10 Patienten konnten 10 unterschiedliche Mutationen mit Hilfe der Gensequenzierung nachgewiesen werden, wobei es sich außer bei einer nonsense-Mutation um missense-Mutationen handelte. Es ist jedoch anzumerken, dass keine MLPA-Analysen durchgeführt und auch nur die kodierenden Abschnitte des Gens untersucht wurden. In einem Fall fand sich eine homozygote Ausprägung der Mutation. Alle anderen Mutationen hatten einen heterozygoten Genotyp. Die Mutationen verteilen sich auf alle Bereiche des Proteins. Besonders aber waren die Spaltstelle des Propeptids, die Gla-Domäne, die Spaltstelle der leichten und schweren Kette, die Spaltstelle des Aktivierungspeptides und eine Aminosäure des aktiven Zentrums des Proteins betroffen. Die drei im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen G103S, A267P und M364T sind bisher nicht in der Literatur beschrieben worden.

Bei vier Patienten konnten durch die Laboranalytik des Protein C-Wertes und der molekulargenetischen Untersuchung des Protein C-Gens die Mutationen auch bei asymptomatischen Familienangehörigen in heterozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Bei diesen Familienangehörigen ist zu überlegen, inwieweit das mögliche Risiko, ein thrombembolisches Ereignis zu erleiden, durch eine prophylaktische Antikoagulation z.B. bei längerer Immobilisation oder bei Schwangerschaft minimiert werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

**Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Aubry ML, Aiach M.** Thirty-three novel mutations in the protein C gene. French INSERM network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. *Thromb Haemost.* 2000 Jan;83(1):86-92.

**Andrew ME, Monagle P, deVeber G, Chan AK.** Thromboembolic disease and antithrombotic therapy in newborns. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:358-74.

**Bates SM, Ginsberg JS.** Clinical practice. Treatment of deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 2004 Jul 15;351(3):268-77.

**Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L.** Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Dec;48 Suppl 1:S53-66. Epub 2010 Nov 5. Review.

**Bertina RM.** Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem.* 1997 Sep;43(9):1678-83.

**Branson HE, Katz J, Marble R, Griffin JH.** Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. *Lancet.* 1983 Nov 19;2(8360):1165-8.

**Büller HR, Agnelli G, Hull RD, Hyers TM, Prins MH, Raskob GE.** Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004 Sep;126(3 Suppl):401S-428S.

**Cooper DN, Youssoufian H.** The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet.* 1988 Feb;78(2):151-5.

**Dahlbäck B.** The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost.* 2007 Jul;98(1):90-6.

**Dahlbäck B.** Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med.* 2005 Mar;257(3):209-23.

**Dahlbäck B.** Procoagulant and anticoagulant properties of coagulation factor V: factor V Leiden (APC resistance) causes hypercoagulability by dual mechanisms. *J Lab Clin Med.* 1999 May;133(5):415-22.

**Dahlbäck B, Villoutreix BO.** The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005 Jun 13;579(15):3310-6. Epub 2005 Mar 13.

**Dávid M, Losonczy H, Nagy A, Kutscher G, Meyer M.** Screening methods in genetic diagnosis of hereditary protein C deficiency. *Orv Hetil.* 1999 Jan 17;140(3):125-32.

**Dávid M, Losonczy H, Sas G, Nagy A, Kutscher G, Meyer M.** Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency. *Br J Haematol.* 2000 Oct;111(1):129-35.

**Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW.** A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry.* 1977 Feb 22;16(4):698-706.

**Drews R, Paleyanda RK, Lee TK, Chang RR, Rehemtulla A, Kaufman RJ, Drohan WN, Luboń H.** Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 7;92(23):10462-6.

**Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL.** Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001 Sep;86(3):809-16.

**Esmon CT.** The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 2000 May;83(5):639-43.

**Esmon CT.** The protein C pathway. *Chest.* 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.

**Esmon CT, Owen WG.** Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Apr;78(4):2249-52.

**Fay PJ,** Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):193-200.

**Franco RF, Reitsma PH.** Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet.* 2001 Oct;109(4):369-84.

**Folsom AR, Ohira T, Yamagishi K, Cushman M.** Low protein C and incidence of ischemic stroke and coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1774-8. Epub 2009 Aug 19.

**Foster DC, Rudinski MS, Schach BG, Berkner KL, Kumar AA, Hagen FS, Sprecher CA, Insley MY, Davie EW.** Propeptide of human protein C is necessary for gamma-carboxylation. *Biochemistry.* 1987 Nov 3;26(22):7003-11.

**Foster DC, Sprecher CA, Holly RD, Gambia JE, Walker KM, Kumar AA.** Endoproteolytic processing of the dibasic cleavage site in the human protein C precursor in transfected mammalian cells: effects of sequence alterations on efficiency of cleavage. *Biochemistry.* 1990 Jan 16;29(2):347-54.

**Foster DC, Yoshitake S, Davie EW.** The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Jul;82(14):4673-7.



**Gandrille S, Aiach M.** Identification of mutations in 90 of 121 consecutive symptomatic French patients with a type I protein C deficiency. The French INSERM Network on Molecular Abnormalities Responsible for Protein C and Protein S deficiencies. *Blood*. 1995 Oct 1;86(7):2598-605.

**Girolami A, Simioni P, Girolami B, Marchiori A, Millar DS, Bignell P, Kakkar VV, Cooper DN.** A novel dysfunctional protein C (protein C Padua 2) associated with a thrombotic tendency: substitution of Cys for Arg-1 results in a strongly reduced affinity for binding of Ca<sup>++</sup>. *Br J Haematol*. 1993 Nov;85(3):521-7.

**Greengard JS, Griffin JH, Fisher CL.** Possible structural implications of 20 mutations in the protein C protease domain. *Thromb Haemost*. 1994 Dec;72(6):869-73.

**Greengard JS, Fisher CL, Villoutreix B, Griffin JH.** Proteins. Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: patterns revealed by three-dimensional molecular modelling of mutations of the protease domain. 1994 Apr;18(4):367-80.

**Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C.** Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981 Nov;68(5):1370-3.

**Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO.** Activated protein C. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:73-80.

**Grinnell BW, Walls JD, Gerlitz B.** Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J Biol Chem*. 1991 May 25;266(15):9778-85.

**Heeb MJ, Griffin JH.** Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 1988 Aug 25;263(24):11613-6.

**Kalafatis M, Mann KG.** Factor V: Dr. Jeckyll and Mr. Hyde. *Adv Exp Med Biol*. 2001;489:31-43.

**Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, Chabrier S, Chan A, deVeber G, Fiedler B, Fullerton HJ, Goldenberg NA, Grabowski E, Günther G, Heller C, Holzhauer S, Iorio A, Journeycake J, Junker R, Kirkham FJ, Kurnik K, Lynch JK, Male C, Manco-Johnson M, Mesters R, Monagle P, van Ommen CH, Raffini L, Rostásy K, Simioni P, Sträter RD, Young G, Nowak-Göttl U.** Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation*. 2010 Apr 27;121(16):1838-47. Epub 2010 Apr 12.

**Kisiel W.** Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest*. 1979 Sep;64(3):761-9.

**Koppelman SJ, van Hoeij M, Vink T, Lankhof H, Schiphorst ME, Damas C, Vlot AJ, Wise R, Bouma BN, Sixma JJ.** Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2292-300.

**Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP.** Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood*. 1995 May 15;85(10):2756-61.

**Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ.** New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008 Dec;29(23):4627-36. Review.

**Levi M, Schultz M, van der Poll T.** Disseminated intravascular coagulation in infectious disease. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Jun;36(4):367-77. Epub 2010 Jul 7.

**Levo A, Kuusmanen K, Holopainen P, Vahtera E, Rasi V, Holopainen P, Rasi V, Krusius T, Partanen J.** Single founder mutation (W380G) in type II protein C deficiency in Finland. *Thromb Haemost*. 2000 Sep;84(3):424-8.

**Lind B, Johnsen AH, Thorsen S.** Naturally occurring Arg(-1) to His mutation in human protein C leads to aberrant propeptide processing and secretion of dysfunctional protein C. *Blood*. 1997 Apr 15;89(8):2807-16.

**Lind B, Koefoed P, Thorsen S.** Symptomatic type 1 protein C deficiency caused by a de novo Ser270Leu mutation in the catalytic domain. *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(3):642-8.

**Lind B, Schwartz M, Thorsen S.** Six different point mutations in seven Danish families with symptomatic protein C deficiency. *Thromb Haemost*. 1995 Feb;73(2):186-93.

**Lind B, van Solinge WW, Schwartz M, Thorsen S.** Splice site mutation in the human protein C gene associated with venous thrombosis: demonstration of exon skipping by ectopic transcript analysis. *Blood*. 1993 Oct 15;82(8):2423-32.

**Lipinski S, Bremer L, Lammers T, Thieme F, Schreiber S, Rosenstiel P.** Coagulation and inflammation. Molecular insights and diagnostic implications. *Hamostaseologie* 2011 May 2;31(2):94-102, 104. Epub 2010 Dec 9.

**Lynas C.** A cheaper and more rapid polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for the detection of the HLA-H gene mutations occurring in hereditary hemochromatosis. *Blood*. 1997 Nov 15;90(10):4235-6.

**Mammen EF, Thomas WR, Seegers WH.** Activation of purified prothrombin to autoprothrombin I or autoprothrombin II (platelet cofactor II or autoprothrombin II-A). *Thromb Diath Haemorrh*. 1960 Dec 15;5:218-49.

**Mann KG, Brummel K, Butenas S.** What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1504-14.

**Matei D, Brenner B, Marder VJ.** Acquired thrombophilic syndromes. *Blood Rev*. 2001 Mar;15(1):31-48.

**Matsuda M, Sugo T, Sakata Y, Murayama H, Mimuro J, Tanabe S, Yoshitake S.** A thrombotic state due to an abnormal protein C. *N Engl J Med.* 1988 Nov 10;319(19):1265-8.

**McClure DB, Walls JD, Grinnell BW.** Post-translational processing events in the secretion pathway of human protein C, a complex vitamin K-dependent antithrombotic factor. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25;267(27):19710-7.

**Miletich JP.** Laboratory diagnosis of protein C deficiency. *Semin Thromb Hemost.* 1990 Apr;16(2):169-76.

**Miletich J, Sherman L, Broze G Jr.** Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med.* 1987 Oct 15;317(16):991-6.

**Millar DS, Grundy CB, Bignell P, Moffat EH, Martin R, Kakkar VV, Cooper DN.** A Gla domain mutation (Arg 15-->Trp) in the protein C (PROC) gene causing type 2 protein C deficiency and recurrent venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993 Apr;4(2):345-7.

**Millar DS, Johansen B, Berntorp E, Minford A, Bolton-Maggs P, Wensley R, Kakkar V, Schulman S, Torres A, Bosch N, Cooper DN.** Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet.* 2000 Jun;106(6):646-53.

**Mimuro J, Muramatsu S, Kaneko M, Yoshitake S, Iijima K, Nakamura K, Sakata Y, Matsuda M.** An abnormal protein C (protein C Yonago) with an amino acid substitution of Gly for Arg-15 caused by a single base mutation of C to G in codon 57 (CGG-->GGG). Deteriorated calcium-dependent conformation of the gamma-carboxyglutamic acid domain relevant to a thrombotic tendency. *Int J Hematol.* 1993 Jan;57(1):9-14.

**Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Kato H.** Protein C Osaka 10 with aberrant propeptide processing: loss of anticoagulant activity due to an amino acid substitution in the protein C precursor. *Thromb Haemost.* 1995 Oct;74(4):1003-8.

**Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Tsushima N, Kato H.** Three missense mutations in the protein C heavy chain causing type I and type II protein C deficiency. *Thromb Haemost.* 1994 Jan;71(1):32-7.

**Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y.** Defective sorting to secretory vesicles in trans-Golgi network is partly responsible for protein C deficiency: molecular mechanisms of impaired secretion of abnormal protein C R169W, R352W, and G376D. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):865-72. Epub 2003 Mar 27.

**Nothwehr SF, Gordon JI.** Structural features in the NH2-terminal region of a model eukaryotic signal peptide influence the site of its cleavage by signal peptidase. *J Biol Chem.* 1990 Oct 5;265(28):17202-8.

**Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F.** Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genet.* 1989 Jan;81(2):191-2.

**Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, Pedersen LG.** Modeling zymogen protein C. *Biophys J*. 2000 Dec;79(6):2925-43.

**Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, Alhenc-Gelas M, Spek CA, de Visser MC, Gandrille S, Reitsma PH.** Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet*. 2009 Sep;126(3):449-56. Epub 2009 May 23.

**Plutsky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR.** Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Feb;83(3):546-50.

**Poort SR, Pabinger-Fasching I, Mannhalter C, Reitsma PH, Bertina RM.** Twelve novel and two recurrent mutations in 14 Austrian families with hereditary protein C deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Apr;4(2):273-80.

**Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, et al.** Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1995 May;73(5):876-89.

**Rezaie AR.** Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):15567-70. Epub 2001 Mar 22.

**Rezaie AR.** Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem*. 2010;17(19):2059-69.

**Rosendaal FR.** Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*. 1999 Apr 3;353(9159):1167-73. Review.

**Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, Schwarz HP, Tans G.** Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27852-8.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

**Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GA.** Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost*. 2007 Sep;98(3):530-42.

**Seegers WH, Novoa E, Henry RL, Hassouna HI.** Relationship of "new" vitamin K-dependent Protein C and "old" autoproteolytic II-a. *Thromb Res*. 1976 May;8(5):543-52.

**Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M.** Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2010 Aug 13;2(3):e2010024.

**Shen L, Dahlbäck B.** Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem.* 1994 Jul 22;269(29):18735-8.

**Simioni P, Kalafatis M, Tormene D, Luni S, Zerbinati P, Barzon L, Palù G, Girolami A.** Abnormal propeptide processing resulting in the presence of two abnormal species of protein C in plasma: characterization of the dysfunctional protein C Padua3 (protein C(R-1L/propeptide)). *Thromb Haemost.* 2001 Oct;86(4):1017-22.

**Smulders YM, Blom HJ.** The homocysteine controversy. *J Inher Metab Dis.* 2011 Feb;34(1):93-9. Epub 2010 Jun 22.

**Steinkamp M, Geva A, Joffe S, Lapp CN, Neufeld EJ.** Chronic disseminated intravascular coagulation and childhood-onset skin necrosis resulting from homozygosity for a protein C Gla domain mutation, Arg15Trp. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002 Nov;24(8):685-8.

**Stenflo J.** A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem.* 1976 Jan 25;251(2):355-63.

**Stenflo J.** Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors. *Blood.* 1991 Oct 1;78(7):1637-51.

**Suttie JW, Hoskins JA, Engelke J, Hopfgartner A, Ehrlich H, Bang NU, Belagaje RM, Schoner B, Long GL.** Vitamin K-dependent carboxylase: possible role of the substrate "propeptide" as an intracellular recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Feb;84(3):634-7.

**Suzuki K, Deyashiki Y, Nishioka J, Toma K.** Protein C inhibitor: structure and function. *Thromb Haemost.* 1989 Jun 30;61(3):337-42.

**Tait RC, Walker ID, Islam SI, McCall F, Conkie JA, Wight M, Mitchell R, Davidson JF.** Protein C activity in healthy volunteers--influence of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1993 Aug 2;70(2):281-5.

**Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT.** Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood.* 2001 Mar 15;97(6):1685-8.

**Thariath A, Castellino FJ.** Highly conserved residue arginine-15 is required for the Ca<sup>2+</sup>-dependent properties of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human anticoagulation protein C and activated protein C. *Biochem J.* 1997 Feb 15;322 ( Pt 1):309-15.

**Tjeldhorn L, Iversen N, Sandvig K, Bergan J, Sandset PM, Skretting G.** Functional characterization of the protein C A267T mutation: evidence for impaired secretion due to defective intracellular transport. *BMC Cell Biol.* 2010 Sep 6;11:67.

**Tsay W, Greengard JS, Griffin JH.** Exonic polymorphisms in the protein C gene: interethnic comparison between Caucasians and Asians. *Hum Genet.* 1994 Aug;94(2):177-8.

**Tsay W, Greengard JS, Montgomery RR, McPherson RA, Fucci JC, Koerper MA, Coughlin J, Griffin JH.** Genetic mutations in ten unrelated American patients with symptomatic type 1 protein C deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Oct;4(5):791-6.

**Tokunaga F, Tsukamoto T, Koide T.** Cellular basis for protein C deficiency caused by a single amino acid substitution at Arg15 in the gamma-carboxyglutamic acid domain. *J Biochem*. 1996 Aug;120(2):360-8.

**Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM.** Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1374-83.

**Váradi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP.** Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost*. 1996 Aug;76(2):208-14.

**Walker FJ,** Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem*. 1980 Jun 25;255(12):5521-4.

**Walker FJ, Sexton PW, Esmon CT.** The inhibition of blood coagulation by activated Protein C through the selective inactivation of activated Factor V. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Dec 7;571(2):333-42.

**Wojcik EG, Simioni P, d Berg M, Girolami A, Bertina RM.** Mutations which introduce free cysteine residues in the Gla-domain of vitamin K dependent proteins result in the formation of complexes with alpha 1-microglobulin. *Thromb Haemost*. 1996 Jan;75(1):70-5.

**Yan SB, Dhainaut JF.** Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S69-74.

**Yang L, Manithody C, Rezaie AR.** Activation of protein C by the thrombin-thrombomodulin complex: cooperative roles of Arg-35 of thrombin and Arg-67 of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 24;103(4):879-84. Epub 2006 Jan 17.

**Zeegers MP, van Poppel F, Vlietinck R, Spruijt L, Ostrer H.** Founder mutations among the Dutch. *Eur J Hum Genet*. 2004 Jul;12(7):591-600.

**Zöller B, García de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B.** Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica*. 1999 Jan;84(1):59-70.

**Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM.** Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 10;1376(3):433-53.

## 7. Thesen

Protein C nimmt eine zentrale Stellung im Gerinnungssystem ein. Mit Hilfe seiner Kofaktoren führt es zur Hemmung der Bildung von Thrombin. Die wesentliche Funktion im Gerinnungssystem ist somit die Herabregulation der Gerinnung.

Eine eingeschränkte Funktionalität von Protein C führt zu einem erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse.

In der Literatur sind ca. 250 Mutationen im Protein C Gens beschrieben.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 13 Patienten mit Protein C Mangel auf Mutationen im Protein C Gen untersucht. Bei 10 Patienten fanden sich Mutationen die den Mangel an Protein C Funktion erklären könnten.

Fast ausnahmslos handelt es sich um missense-Mutationen, die zum Austausch einer Aminosäure führen, und in allen funktionellen Teilbereichen des Proteins vorkommen.

Drei Mutationen betreffen Spaltstellen des Proteins, so zwischen Propeptid und Gla-Domäne (R-1L), zwischen leichter und schwerer Kette (R157Q) und die des Aktivierungspeptids (R169Q). Die Mutation R-1L führte zu einem verlängerten Protein und vermutlich einer daraus resultierenden gestörten Faltung der Gla-Domäne. Aus der Mutation R157Q resultiert die funktionseingeschränkte einstrangige Form des Proteins. Bei der Mutation R169Q wird die Aktivierung des Proteins gestört. Zusätzlich scheint das Protein aber auch einer eingeschränkten Sekretion aus den Hepatozyten bzw. einem beschleunigten Abbau zu unterliegen.

Eine Mutation liegt in der Gla-Domäne und führt zu einer gestörten Interaktion mit Kalziumionen und Phospholipidoberflächen (R15W).

Eine Mutation verändert die Aminosäure Histidin an Position 211, die zum aktiven Zentrum des Proteins gehört (H211Q). Zwei weitere Mutationen liegen in der Nähe der beiden anderen Aminosäuren des aktiven Zentrums und führen vermutlich ebenfalls zu einer Störung des Zentrums (A267T, A267P und M364T).

## Thesen

Die Mutationen G103S, A267T, A267P und M364T liegen nicht direkt an Schlüsselpositionen des Proteins und führen offenbar zu Veränderungen der Proteinstruktur.

Die einzige nonsense-Mutation betrifft die Aminosäureposition 92 (E92Stop). Möglich ist aufgrund der Position zwischen Exon 5 und 6 auch eine Störung im Spleißvorgang wie bei den in der Literatur beschriebenen Mutationen R91R und R91P.

Die Ursachen für eine verminderte Blutkonzentration des mutierten Protein C sind ein gestörter intrazellulärer Transport während der posttranslationalen Modifikation, eine eingeschränkte Sekretion und ein frühzeitiger Abbau.

Von den 10 nachgewiesenen Mutationen wurden 3 Mutationen bisher nicht in der Literatur beschrieben.



## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotionsprüfung vorgelegte Dissertation mit dem Titel "Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit quantitativem und funktionellem Protein C-Mangel" selbstständig ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die in dieser Dissertation angegeben wurden.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass diese Dissertation zuvor weder an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

## **9. Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. P. Schuff-Werner für die Vergabe des Themas dieser Dissertation und die Betreuung bedanken.

Des Weiteren danke ich besonders den Mitarbeitern des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock und PD. Dr. med. Steiner für die Hilfe im Labor und bei der Auswertung der Daten.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. F. Bergmann. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich meinem Vater Prof. Dr. med. R. Hofmockel und meiner Mutter Dr. med. S. Hofmockel für ihre Unterstützung, ihre ständige Motivation und ihre Geduld danken.

Zuletzt auch einen herzlichen Dank an meine Tante Marianne Vorndran für die abschließende Durchsicht der Arbeit.